

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

Monitorización de sistemas dinámicos mediante espectroscopía de RMN ultrarrápida

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Zulay D. Pardo Botero

Directores

Antonio Herrera Fernández
Roberto Martínez Álvarez

Madrid, 2014



Departamento de Química Orgánica I
Facultad de Ciencias Químicas
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Monitorización de sistemas dinámicos
mediante espectroscopía de
RMN Ultrarrápida**

TESIS DOCTORAL

Zulay D. Pardo Botero

Madrid, 2014

*A mis padres y hermanas
A Juan y a nuestro bebé que está por nacer
Vosotros sois mi mejor motivación cada día*

*"You are trying to find out how God made the world,
just like Jacob wrestling with the angel"*

Isidor Isaac Rabi

Porque por medio de Él (Jesucristo) fueron creadas todas las cosas en el cielo y en la tierra, visibles e invisibles, ya sean tronos, poderes, principados o autoridades: Todo ha sido creado por Él y para Él. Él es antes que todas las cosas y en Él todas las cosas permanecen.

Colosenses 1:16



D. ANTONIO HERRERA FERNÁNDEZ, Catedrático de Química Orgánica y Director del CAI de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid y D. ROBERTO MARTÍNEZ ÁLVAREZ, Catedrático de Química Orgánica de la Universidad Complutense y Director del Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN: Que el trabajo reflejado en la siguiente memoria titulada "Monitorización de sistemas dinámicos mediante espectroscopía de RMN Ultrarrápida", ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica I y en el CAI de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid, por D^a. Zulay Diney Pardo Botero y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, 28 de abril de 2014

Fdo.: Antonio Herrera Fernández

Fdo.: Roberto Martínez Álvarez



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas y en el CAI de R.M.N. y R.S.E. de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Profesores Antonio Herrera Fernández y Roberto Martínez Álvarez dentro del marco de los proyectos CTQ2007-61973 y CTQ2010-14936.



El autor agradece la financiación otorgada por la Universidad Complutense de Madrid mediante la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (2009-2013), gracias a la que ha sido posible la realización de este trabajo.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis se recogen en las siguientes publicaciones:

— **Monitoring Mechanistic Details in the Synthesis of Pyrimidines via Real-Time , Ultrafast Multidimensional NMR Spectroscopy**

Zulay D. Pardo, Gregory L. Olsen, María Encarnación Fernández-Valle, Lucio Frydman, Roberto Martínez-Álvarez, Antonio Herrera.

J. Am. Chem. Soc. **2012**, *134*, 2706-2715.

- **2D Ultrafast HMBC: A Valuable Tool for Monitoring Organic Reactions**
Antonio Herrera, Encarnación Fernández-Valle, Eva M. Gutiérrez, Roberto Martínez-Álvarez, Dolores Molero, Zulay D. Pardo, Elena Sáez
Org. Lett. **2010**, 12 (1), 144-147
- **Real-Time Monitoring of Organic Reactions with Two-Dimensional Ultrafast TOCSY NMR Spectroscopy**
Antonio Herrera, Encarnación Fernández-Valle, Roberto Martínez-Álvarez, Dolores Molero, Zulay D. Pardo, Elena Sáez, Maayan Gal
Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, 48, 6274–6277

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directores de Tesis los Profesores Antonio Herrera y Roberto Martínez. Antonio, gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en el grupo, por haber dispuesto todo en el laboratorio para que pudiera trabajar a gusto y abrirme la puerta del CAI de RMN y RSE de la UCM. A Roberto, gracias por tus enseñanzas, por estar pendiente de mi trabajo y por tratar siempre de sacar partido a nuestras diferencias culturales. A los dos muchas gracias por vuestra disposición, dedicación y esfuerzo en todo momento y especialmente por vuestro trato siempre respetuoso y comprensivo, en muchas ocasiones como a una hija.

Este trabajo, sin duda, no hubiera sido posible sin la ayuda fundamental de Lola, Marién y Elena. Lola, gracias por tu tiempo y enseñanzas, por ser la jefa, pero también amiga y madre. Además de resonancia he aprendido de cocina, de jardinería y hasta de cómo ser mamá! Gracias por los veranos en compañía de Jose Luis y Javi; ellos siempre han sido, sin lugar a dudas, lo mejor de mis fríos agostos. A Marién, por la alegría y entusiasmo con que me has enseñado sobre UF-NMR, tu motivación y empeño no me han dejado renunciar en nuestras batallas interminables con el Ultrafast. A Elena, por tu paciencia, por el tiempo de máquina, por tus valiosos aportes y por estar siempre atenta a lo que he necesitado.

También quiero agradecer a Ángel, por tu disposición y por esperarme muchos días más allá de tu horario. Eres un buenazo! A David y Palmira, gracias, porque aunque no nos vemos mucho, siempre me habéis hecho sentir parte del grupo.

A Esther, Marta y Teresa. Ser extranjero no es fácil, ni siquiera en mi caso, que parece que he venido para quedarme. En muchas ocasiones llegó a pasar por mi mente que era casi imposible encajar y tener amistad con personas con las que eres tan “diferente”, pero vosotras me habéis permitido descubrir que no lo somos tanto. Gracias por los tiempos de comida, por enseñarme vuestra química, por los cumpleaños, las charlas de historias alegres y otras menos, sois realmente especiales para mí.

Aunque siempre he estado abajo en el CAI, o arriba en el último rinconcito de la 4^{ta} planta y por tanto no me entero de muchas cosas, quiero agradecer al resto

de compañeros del Departamento de Orgánica, por dejarme productos para mis pruebas y si bien, he compartido poco con vosotros (calentando la comida, en las ya “antiguas” fiestas de navidad, o simplemente en el ascensor), de todos algo me llevo. A Alex y Paula, gracias por estar allí, por hacerme sentir como una más. A los técnicos de laboratorio, Javi mañana, Javi tarde y Laura, gracias por vuestro fenomenal trabajo. A Juanjo, por tu disposición y buen ánimo para ayudar en todo.

A mi familia, mis padres José y Sulay, mis hermanas Slendy y Laurita. Sois la razón por la cual estoy en este país. Gracias por vuestro apoyo y motivación para seguir adelante con mi carrera y todas las cosas que he emprendido, porque habéis soportado mi falta de tiempo siempre. Gracias por vuestra incondicionalidad.

A Juan, mi ayuda idónea. Gracias por encargarte desinteresadamente de tantas cosas, por soportar mi mal humor y mis quejas. Por motivarme en momentos de desánimo, e incluso por dejar a un lado tus propios deberes, siempre con la mejor disposición. Llegar al final de esta tarea no ha sido fácil, pero hoy ya casi lo tengo, y en gran parte te lo debo a ti. Has sido fundamental para terminar justo a tiempo, antes de otra gran aventura juntos: la de ser padres.

Gracias a Dios, por tener el control de mi vida, por estar a mi lado, por fortalecerme en mis debilidades y ser fuente de mi felicidad. Nada de lo que hacemos en ciencia, escapa de su conocimiento. *El Todo lo hizo hermoso en su tiempo; y ha puesto eternidad en el corazón de ellos, sin que alcance el hombre a entender la obra que ha hecho Dios desde el principio hasta el fin. Eclesiastés. 3:11.*

No quiero dejar pasar esta oportunidad sin agradecer al CAI de RMN y RSE de la UCM por las facilidades de los equipos de resonancia, al Taller Mecánico por la elaboración de algunas piezas del sistema de inyección y los discos para la muestra de calibración de gradientes.

Al Dr. Israel Fernández y Ángel Sánchez por los cálculos teóricos de los desplazamientos químicos de algunas de las especies intermedias detectadas a lo largo de este trabajo.

Al profesor Lucio Frydman y su grupo de investigación, por haberme abierto las puertas de su laboratorio en el Weizmann Institute of Science en Rehovot, Israel, sus enseñanzas en la técnica de UF-NMR y su gran hospitalidad.

Al Grupo Especializado en RMN (GERMN) de la Sociedad Española de Química por las ayudas económicas de su bolsa de viaje, con las que he podido asistir a diferentes congresos y seminarios en los que nuestros trabajos han sido presentados.

Índice

Abreviaturas, acrónimos y símbolos empleados	i
Nota sobre puntuación.....	iii
Nota sobre las referencias bibliográficas	iii
Abstract	iv
I. Introducción	3
II. Antecedentes	9
II.1. Características de la RMN 2D clásica	11
II.2. Secuencias rápidas de RMN.....	18
II.2.1. Técnicas de muestreo reducido	22
II.2.1.1. Muestreo no uniforme y radial	22
II.2.1.2. Submuestreo lineal (espectros plegados)	23
II.2.1.3. Muestreo selectivo (espectroscopía de Hadamard)	25
II.2.2. Técnicas de pulsado rápido	26
II.2.2.1. Experimentos SOFAST y BEST	26
II.2.3. Técnicas de tiempo compartido	28
II.2.3.1. Espectroscopía de detección en paralelo (PANSY).....	28
II.2.3.2. Adquisición múltiple mediante evolución compartida (MATS).....	29
II.2.3.3. Espectroscopía paralela localizada (PALS).....	30
II.3. Espectroscopía de RMN Ultrarrápida (UF-NMR)	32
II.3.1. Principios y características generales de la UF-NMR.....	35
II.3.1.1. Gradientes de campo y pulsos de radiofrecuencia (RF)	35
II.3.1.2. Excitación: Codificación espacial	38
II.3.1.3. Detección: Decodificación espacial	45
II.3.2. Aplicaciones de la UF-NMR.	51
II.3.3. Ventajas e inconvenientes de la UF-NMR	66
II.4. Aspectos prácticos en la realización de los experimentos de UF-NMR	68
II.4.1. Dependencias entre los parámetros de adquisición	68
II.4.2. Programas de pulsos y herramientas informáticas	71
II.5. Monitorización de sistemas dinámicos mediante espectroscopía de RMN tradicional en tiempo real.	76
II.6. Reacción de compuestos carbonílicos con reactivos electrófilos en presencia de nucleófilos.....	80
II.6.1. Reacción de compuestos carbonílicos con reactivos electrófilos	80
II.6.2. Captura de las especies generadas mediante nucleófilos presentes en el medio de reacción	83

II.6.2.1. Síntesis de pirimidinas a partir de cetonas y nitrilos.....	86
II.6.3. Propuesta mecanística de la síntesis de pirimidinas a partir de cetonas y nitrilos en presencia de Tf_2O	91
II.7. Utilización de programas de modelización molecular en el estudio de mecanismos de reacción	93
III. Objetivos	99
IV. Resultados y discusión	101
1. Capítulo 1: Algunos problemas prácticos en la realización de experimentos de UF-NMR	
1.1. Límites de detección.....	103
1.1.1. Límites de detección para las secuencias de acoplamiento escalar homonuclear 2D UF-COSY y 2D UF-TOCSY.....	104
1.1.2. Límites de detección para las secuencias de acoplamiento escalar heteronuclear 2D UF-HSQC y 2D UF-HMBC.....	108
1.2. Calibración de gradientes de campo magnético	112
2. Capítulo 2: Estudio de sistemas dinámicos mediante técnicas de UF-NMR 2D basadas en acoplamientos homonucleares	
2.1. 2D UF-TOCSY: Estudio mecanístico de la reacción de la 3-pentanona y anhídrido triflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3	119
3. Capítulo 3: Estudios de sistemas dinámicos mediante técnicas de UF-NMR 2D basadas en acoplamientos heteronucleares	
3.1. Estudio mecanístico de la reacción de la acetofenona marcada con ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O), empleando secuencias de UF-NMR de acoplamiento heteronuclear.....	131
3.1.1. 2D UF-HSQC: reacción de acetofenona- β - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O)	134
3.1.2. 2D UF-HMBC: reacción de acetofenona- α - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O)	137
3.2. 2D UF-HSQC Selectivo: Aplicación a la reacción de acetofenona y anhídrido triflico (Tf_2O) sin marcaje isotópico	146

4. Capítulo 4: Aplicación de secuencias de UF-NMR 2D combinadas

- 4.1. Secuencia en tándem homo-heteronuclear 2D UF-TOCSY-HMBC: Estudio mecanístico de la reacción de la ciclohexanona- α - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3 163

5. Capítulo 5: Estudio de otros sistemas dinámicos. Reacción de Diels-Alder y Michaelis-Arbuzov

- 5.1. Seguimiento en tiempo real de una reacción de cicloadición Diels-Alder [4+2] 181
- 5.2. 2D ^1H , ^{31}P UF-HMBC: Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov 189
- 5.2.1. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en ausencia de ácido de Lewis 193
- 5.2.2. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en presencia de ácido de Lewis 195

V. Conclusiones 201

VI. Parte experimental 209

- VI.1. Límites de detección 209
- VI.1.1. Límites de detección de secuencias de acoplamiento escalar homonuclear UF-COSY y UF-TOCSY 209
- VI.1.2. Límites de detección de secuencias de acoplamiento escalar heteronuclear UF-HSQC y UF-HMBC 211
- VI.2. Calibración de los gradientes 214
- VI.3. Sistema de inyección 215
- VI.4. Estudio mecanístico de la reacción de la 3-pentanona y anhídrido triflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3 , mediante la aplicación de UF-TOCSY 216
- VI.5. Estudio mecanístico de la reacción de la acetofenona enriquecida en ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3 , empleando secuencias de UF-NMR de acoplamiento heteronuclear 217
- VI.5.1. UF-HSQC: reacción de la acetofenona- β - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O) 217
- VI.5.2. UF-HMBC: reacción de la acetofenona- α - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O) 218
- VI.5.3. UF-HSQC Selectivo: reacción de la acetofenona y anhídrido triflico (Tf_2O) 220
- VI.5.4. UF-HSQC Selectivo: reacción de la acetofenona- β - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O) 221

VI.6. Secuencia en tándem homo-heteronuclear UF-HMBC-TOCSY: Estudio mecanístico de la reacción de la ciclohexanona- α - ^{13}C y anhídrido tríflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3	222
VI.7. Seguimiento en tiempo real de una reacción de cicloadición Diels-Alder [4+2].....	224
VI.8. UF-HMBC ^1H , ^{31}P : Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov.....	225
VI.8.1. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en ausencia de ácido de Lewis.....	226
VI.8.2. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en presencia de ácido de Lewis.....	227
VI.9. Síntesis de alquil y aril pirimidinas: Método general.....	228
VI.9.1. Síntesis de 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina- d_6 (55).....	228
VI.9.2. Síntesis de la 2,4-dimetil-5- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 (57)	229
VI.9.3. Síntesis de la 2,4-dimetil-6- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 (60)	229
VI.9.4. Síntesis de la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina (66)	230
VI.9.5. Síntesis de la 2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahidroquinazolina- d_6 (77)	230
VI.10. Síntesis de triflatos de vinilo: Método general.....	231
VI.10.1. Síntesis del triflato de 1-fenilvinilo (67)	231
VI.11. Síntesis de los aductos de cicloadición Diels-Alder: Método general	232
VI.11.1. Síntesis de sin/anti 2-fenil-4,5,6,7,8-pentametil-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3-diona (84).....	232
VI.11.2. Síntesis de sin/anti 1,2,3,4,11-pentametil-1,4,4a,9a-tetrahidro-1,4-metanoantraceno-9,10-diona (86).....	233
VI.11.3. Síntesis de anti 1,4,5,6,7-pentametilbicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3-dicarboxilato de etilo (88)	233
VII. Anexos	235
Anexo A: Programas de pulsos	237
Anexo B: Publicaciones.....	273

Abreviaturas, acrónimos y símbolos empleados

En esta memoria se han empleado acrónimos y abreviaturas recomendados en *Magnetic Resonance in Chemistry*, así como otros de uso frecuente en terminología química.

A.M.	Modulado en Amplitud
c	cuadruplete
C.T.	Tiempo Constante
CFDE	clorofosfato de dietilo
COSY	CORrelation SpectroscopY
δ	desplazamiento químico
ΔE	diferencia energética
d	doblete
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
EPI	Echo Planar Imaging
EPSI	Echo Planar Spectroscopic Imaging
FDB	fosfonato de dietilbencilo
FID	Free Induction Decay
fMRI	functional Magnetic Resonance Imaging
γ	constante giromagnética
G_a	Gradiente de adquisición
G_e	Gradiente de excitación
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
INEPT	Insensitive Nuclei by Polarization Transfer
IRM	Imagen de Resonancia Magnética
J	constante de acoplamiento
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
μ	momento magnético
m	multiplete
MATS	Multiple-FID Acquisition Time-Shared evolution
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy

NCS	<i>N</i> -clorosuccinimida
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<i>ns</i>	número de scans
OTf	triflato CF ₃ SO ₂ O
PALSY	PARallel Localized acquisition Spectroscopy
PANSY	Parallel Acquisition NMR Spectroscopy
PMCP	pentametilciclopentadieno
ppm	partes por millón
PUFSY	Parallel UltraFast Spectroscopy
RF	Radio Frecuencia
<i>rg</i>	ganancia del receptor
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN 1D	Resonancia Magnética Nuclear monodimensional
RMN 2D	Resonancia Magnética Nuclear bidimensional
<i>s</i>	singlete
S/R	Relación Señal/Ruido
SOFAST	Band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient
<i>t</i>	triplete
<i>T</i> ₁	tiempo de relajación longitudinal
<i>T</i> ₂	tiempo de relajación transversal
TCE- <i>d</i> ₂	tetracloroetano- <i>d</i> ₂
TF	Transformada de Fourier
Tf ₂ O	anhídrido trifluorometanosulfónico
TMS	tetrametilsilano
TOCSY	TOTAL Correlation Spectroscopy
<i>TR</i>	Tiempo de Repetición
UF	UltraFast
UF-NMR	UltraFast Nuclear Magnetic Resonance
WATERGATE	WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation

Notas sobre la puntuación

Con el fin de simplificar la publicación de resultados en revistas internacionales que requieren la utilización del sistema científico de puntuación, se ha adoptado este sistema a lo largo de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de comas, lo que ha sido aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el *Diccionario Panhispánico de Dudas* desde su primera edición en octubre de 2005.

Nota sobre las referencias bibliográficas

En la presente Memoria, las referencias bibliográficas se encuentran a pie de página. Ineludiblemente existen citas bibliográficas que se han repetido en diferentes páginas al tratar ciertos temas, pero se ha decidido mantener este criterio y facilitar en cada apartado la información bibliográfica completa. También se han incluido algunos comentarios y aclaraciones sobre aspectos y nomenclatura específicos de la RMN, así como detalles acerca de la realización de experimentos.

Abstract

MONITORING DYNAMIC SYSTEMS BY ULTRAFAST NMR SPECTROSCOPY

Introduction

Today, NMR spectroscopy is the technique of choice for investigating molecular structure, dynamics and interactions in solution. The major drawback of conventional multidimensional NMR is the long experimental time needed for recording its data, a reflection of the hundreds or even thousands of experimental repetitions that are inherent in this kind of spectroscopy. Therefore, in the last years many efforts have been invested in improving NMR possibilities in terms of experimental time. Among them is UF-NMR spectroscopy, which has been introduced and developed by Lucio Frydman et. al. This new methodology offers a great improvement in speed for multidimensional NMR measurements, since these kinds of experiments can be done in a single scan or in a small number of them. Thus, ultrafast NMR (UF-NMR) has opened the way for potential applications in different areas such as the monitoring of chemical and biophysical transient systems in real time. For this reason, specific NMR procedures must be optimized in order to successfully apply this promising methodology.

Objectives

In this thesis the author will focus on the application of ultrafast NMR technique for the real time study of common dynamic systems such as organic reactions. To do this, an optimization of the experiments is necessary. This work took place in the spectrometers of the CAI de RMN y RSE de la UCM.

The aim is to study different organic reactions. Some of these focused on the reaction of ketones with strong electrophiles related to the synthesis of pyrimidines and other heterocyclic compounds. This chemistry was developed by our research group. Different homo-, heteronuclear and combined dynamic UF-NMR pulse sequences will be applied. From the results of these real-time observations, important conclusions should be expected about the reaction mechanisms involved as well as kinetic data. Furthermore, from these results the specific application characteristics of the different ultrafast techniques will be

evaluated. This should provide useful guidelines to bring the experimental implementation of this NMR technique closer to the study of reactions and real systems.

Results

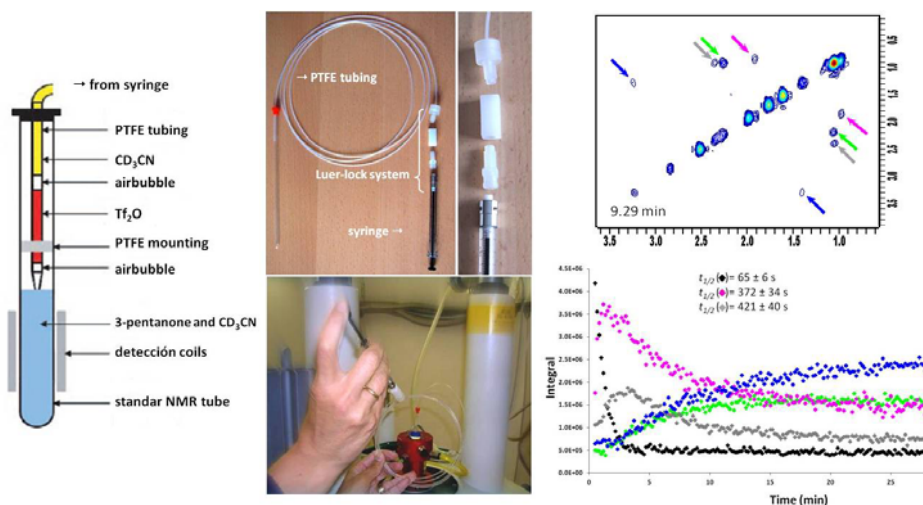
The main results of this work can be summarized as follows:

In Chapter 1, some important experimental aspects have been explored, such as the concentration limits for homo- and heteronuclear ultrafast experiments and the handling of gradients intensity to achieve the desired spectral window. Following results have been obtained in a 500 MHz spectrometer from CAI de RMN y RSE de la UCM:

- The lowest concentration for obtaining homonuclear correlation spectra UF-COSY and UF-TOCSY in one scan ($ns = 1$) with the appropriate S/N ratio, is 20 mM.
- The concentration limit that allows us to record heteronuclear correlation spectra ^1H , ^{13}C UF-HSQC in two scans ($ns = 2$), and in terms of appropriate S/N ratio is 300 mM, while for ^1H , ^{13}C UF-HMBC spectra is 500 mM. The concentration limit for obtaining heteronuclear ^1H , ^{31}P correlation spectra in two scans ($ns = 2$) with the appropriate S/N ratio is 50 mM.
- The maximum intensity of the field gradient for this spectrometer is lower than the value indicated by Bruker A.G. (53.5 G/cm). Although the gradient intensity increases linearly in the range studied, its behavior does not match our expectations. The difference between the real gradient strength, G_z , and the calculated, increases with the percentage strength of the applied gradient. Due to this, it is necessary to perform the scale calibration in the indirect dimension of UF-NMR spectra, using the utility XprocUFnmr processing software developed in our group.

In Chapter 2, experiments for the real-time monitoring of an organic reaction by homonuclear 2D UF-TOCSY were carried out. As the system to be studied we have selected the reaction of 3-pentanone with triflic anhydride in the presence of acetonitrile- d_3 , which leads to 4-ethyl-2,5,6-trimethylpyrimidine- d_6 . The results were as follows:

- The reaction was carried out in standard NMR equipment 500 MHz in a 5 mm resonance tube. An amplitude-modulated UF-TOCSY pulse sequence developed in our research group was applied, and 525 2D UF-TOCSY spectra were recorded in 87.53 min, in which we can follow the course of the reaction.
- For the first time the presence of cationic species type nitrilium intermediate salts has been detected. To our knowledge spectroscopic evidence of their existence was not reported until now. The structure assignment of the detected species was confirmed by modeling with the Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8 program. The observed values are in good agreement with the calculated values.
- The findings are in agreement with the previously proposed mechanism, providing important spectroscopic evidence of the intermediate species involved in it and demonstrating the ideal characteristics of the UF-NMR for monitoring organic reactions.

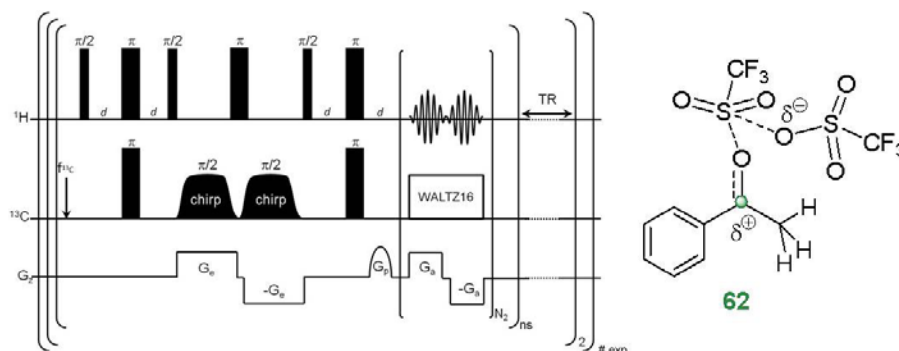


- It has been possible to obtain kinetic data of the process studied, giving valuable information on the concentration of the participating species and allowing calculation of the half life ($t_{1/2}$) of each intermediate.

In Chapter 3, the applicability of different heteronuclear correlation ultrafast sequences in monitoring dynamic systems has been studied. These sequences present detection problems arising from the low S/N ratio of the correlation

signal obtained compared with homonuclear ultrafast sequences. Therefore, in the study of systems with low sensitivity nuclei (^{13}C , ^{15}N) it is almost necessary to use labeled substrates. However, important results based on unlabeled molecules will be also displayed. As the model system to be studied, we choose the reaction of acetophenone with Tf_2O in the presence of acetonitrile- d_3 , which leads to 2,4-dimethyl-6-phenylpyrimidine- d_6 as the main product. The results were as follows:

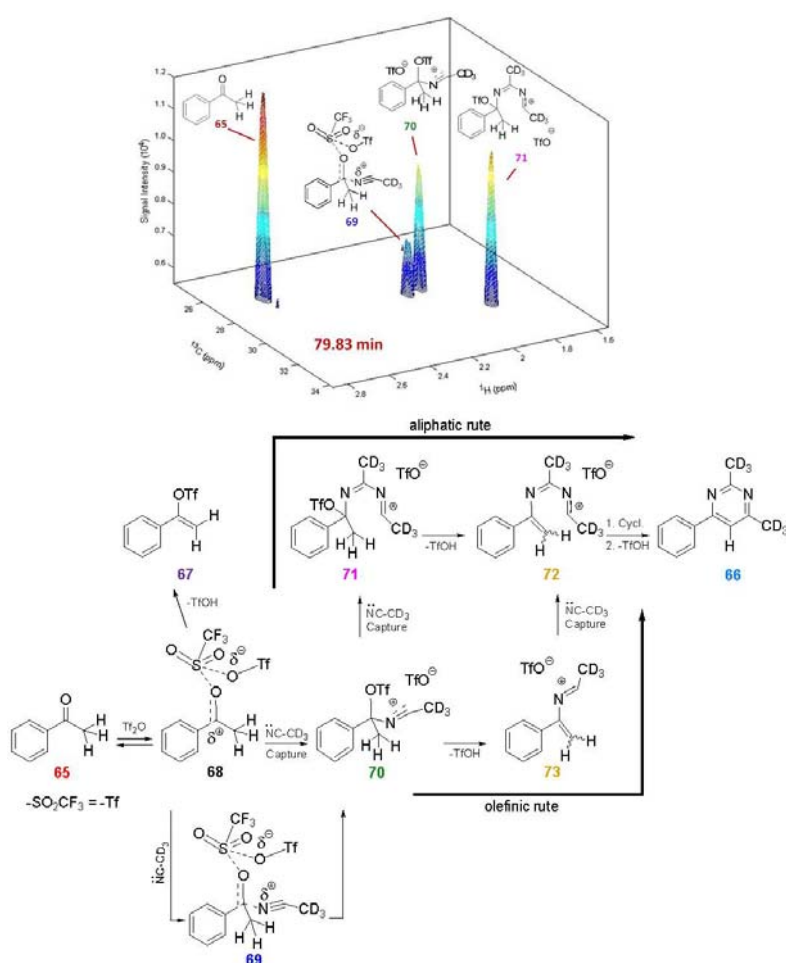
- Amplitude-modulated UF-HSQC and UF-HMBC pulse sequences (previously developed in our research group) were successfully applied to labeled compounds. In collaboration with Lucio Frydman group, we have been developed and then optimized the acquisition parameters of UF-HSQC Selective sequence for unlabeled molecules.
- For the first time a double window UF-HMBC sequence has allowed the detection of the intermediate triflioxycarbenium cation **62** stabilized by a counterion triflate, formed in the reaction of ketones such as acetophenone and triflic anhydride. This intermediate has been proposed numerous times in the mechanisms to give an explanation for this type of reaction, but until now had no real spectroscopic evidence for its existence.



- The sequence UF-HSQC Selective has proven capable of being applied to studies under natural abundance conditions and has shown the presence of several aliphatic and olefinic intermediates. This have confirmed our previous results conducted by UF-HMBC for labeled acetophenone- α - ^{13}C .
- The structural assignment of all species detected by the different sequences

of UF-NMR heteronuclear correlation has been established by using the modeling Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8 software and through more complex calculations with a set of Gaussian 09 programs and the GIAO-PCM-M06-2X/6-31 + G* method. The observed values are in good agreement with the calculated values.

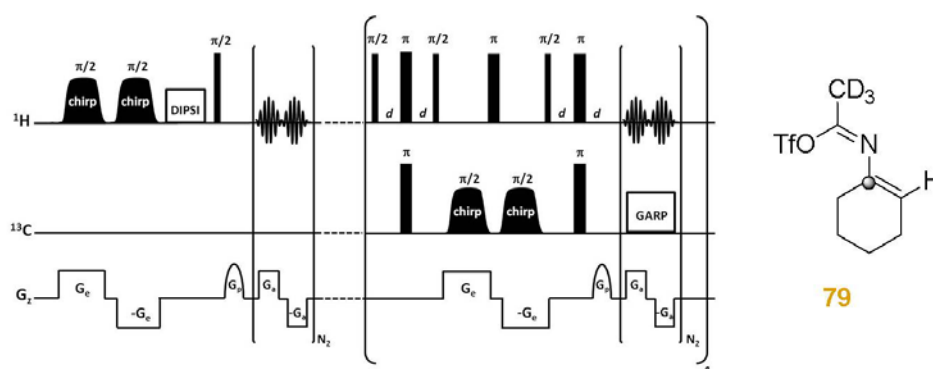
- The findings have clearly established two different mechanistic pathways through which these reactions take place, called the aliphatic and olefinic route.



Chapter 4 deals with the study of ultrafast combined homo and heteronuclear sequences. A combined study of scalar correlations, homo- and heteronuclear, should certainly provide an important structural characterization of small and

medium sized molecules in solution. Proof of this are the different versions of standard NMR experiments described in two steps, in which a heteronuclear sequence (HSQC or HMBC) is combined with a homonuclear one (COSY or TOCSY). Applying an ultrafast sequence with both homo- and heteronuclear schemes for monitoring dynamic processes undoubtedly provides more complete information on the evolution of organic reactions and, in particular, about the possible intermediates and products formed during the reaction. This will be addressed in this chapter that studies the reaction of an alicyclic ketone such as cyclohexanone- α - ^{13}C with triflic anhydride (Trf_2O) and acetonitrile- d_3 , which leads to 2,4-dimethyl-5,6,7,8 tetrahydroquinazoline- d_6 . This raised the following aspects:

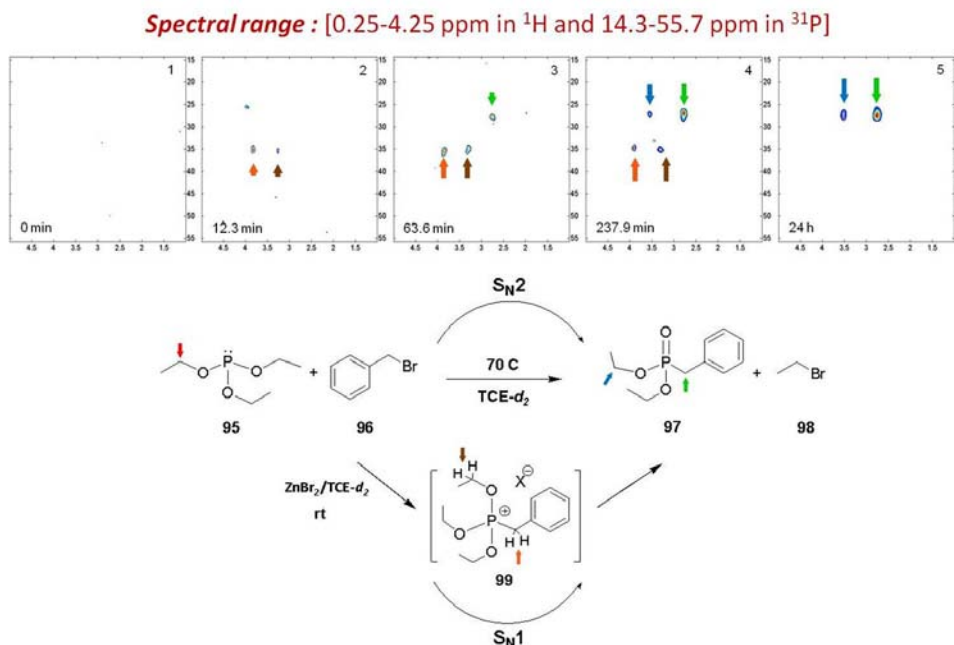
- Tandem amplitude-modulated pulse sequence UF-HMBC-TOCSY has been used for monitoring. Acquisition parameters were optimized to achieve both a high S/N ratio and resolution. Two different spectral ranges were studied. A total of 500 2D spectra UF-TOCSY-HMBC were recorded in a 4.96 hours.
- Through the combined UF-HMBC-TOCSY sequence, cross peaks from a new intermediate species **79** with non-ionic character have been detected. The structural assignment of all species detected in this study has confirmed using the modeling Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8 software and in a more exhaustive way, through more complex calculations with Gaussian 09 set of programs and GIAO method-PCM-M06-2X/6-31 + G^* . The observed values are in good agreement with those calculated.



- The results obtained have allowed us to propose an alternative mechanistic pathway for the formation of pyrimidines from cyclic ketones. It was possible to obtain kinetic data of the studied process, thereby obtaining valuable information on the concentration of participating species and their half lives ($t_{1/2}$).
- Finally, these results confirm once again that the UF-NMR methodology applied to the monitoring of both homo- and heteronuclear coupling is an effective method to study mechanisms of organic reactions in real time.

In Chapter 5 we have tried to extend the application of UF-NMR to different reactions of interest to organic chemistry. One of them is the concerted reactions, which is an important part of organic chemistry. Therefore, since it has shown the utility of UF-NMR in monitoring stepwise reactions, whose mechanism is developed through different reactive intermediates, we wanted to assess the results of real-time monitoring of an important concerted process such as the Diels Alder cycloaddition reaction. The other system studied is the Michaelis-Arbuzov rearrangement involving C-P bond formation. The results are summarized below:

- By applying homonuclear correlation sequence UF-TOCSY we explore the cycloaddition reaction between 1,2,3,4,5-pentamethylcyclopentadiene and diethyl fumarate to form 1,4,5,6,7-pentamethylbicyclo [2.2.1] hept-5-ene-2,3-dicarboxylate. Recorded were 993 2D UF-TOCSY spectra in 104.83 min, in which we could follow the course of the reaction. Although in this case it was possible to observe the evolution in real-time of reactants to products, it was not possible to apply dynamic experiments to try to detect dipolar interaction between reactants.
- For the first time, a study using ultrafast dynamic ^{31}P -NMR spectroscopy has been carried out. This therefore extends the possibilities for monitoring different organic reactions. Applying the ^1H , ^{31}P UF-HMBC sequence permits the study in real time of the Michaelis-Arbuzov reaction between triethyl phosphite and benzyl bromide, in the presence and absence of the catalyst zinc bromide (ZnBr_2) to form diethylbenzyl phosphonate.



- Spectroscopic evidence about the formation of the salt intermediate benciltriethoxyphosphonium bromide **99** has been found in real time. The ^1H , ^{31}P UF-HMBC sequence has provided direct and accurate information on the structural changes in the reaction center (^{31}P atom), as well as in the nuclei found in neighboring positions. This sequence has shown to be a useful tool for monitoring dynamic systems such as the Michaelis-Arbuzov rearrangement.

Conclusions

The results presented in this work show the ability of homonuclear and heteronuclear UF-NMR as a technique for real-time monitoring of dynamic systems such as common organic reactions. Thus for the first time has been possible to obtain mechanistic details and kinetic data of participating intermediate species.

I. Introducción

Evolución de la RMN:

La espectroscopía es el estudio de la interacción entre los átomos o las moléculas y la radiación electromagnética. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una rama de la espectroscopía que hace uso de las propiedades magnéticas intrínsecas de los núcleos atómicos. Desde la primera vez que el fenómeno de la RMN fue observado, esta metodología ha sido testigo de un crecimiento sin precedentes como técnica analítica. La lista de las diferentes áreas del conocimiento en las que hoy en día se aplica va en aumento y entre las más destacadas se encuentran la química, la biología, la medicina, la ciencia de los materiales, la geología y áreas de seguridad o de calidad alimentaria.¹

Sus descubridores fueron Otto Stern (Universidad de Carnegie Mellon), quien en 1924 y mediante la técnica de haces moleculares calculó el momento magnético del núcleo de la plata y además halló para el momento magnético del núcleo de hidrógeno (protón) un valor 2.5 veces mayor que el previsto por la teoría² e Isidor Isaac Rabi (Universidad de Columbia), quien en 1938 desarrolló el método de resonancia que permitió el estudio de las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos.³ Ambos fueron galardonados con el premio Nobel de física en 1943 y 1944 respectivamente.

A pesar de estos incipientes inicios, la RMN sólo comenzó a extenderse durante la década de 1940 cuando Felix Bloch (Universidad de Stanford) y Edward M. Purcell (Universidad de Harvard) desarrollaron, de manera independiente, nuevos métodos para la determinación absoluta de los efectos magnéticos nucleares tanto en líquidos como en sólidos.^{4,5} Estos científicos compartieron el premio Nobel de física en 1952.

Alrededor de 1950 se descubrió que la frecuencia de resonancia de los núcleos depende no solo de la intensidad del campo magnético y de la naturaleza del núcleo atómico, sino también de su ambiente químico, es decir, que los diferentes núcleos podían influenciarse unos a otros y generar un número adicional de señales en el espectro de RMN. De esta manera quedó al

¹ Emsley, J.W.; Feeney, J. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2007**, 50, 179-198.

² Gerlach, W.; Stern, O. *Ann. Phys. Leipzig*. **1924**, 74, 673-699.

³ Rabi, I.I.; Zacharias, J.R.; Millman, S.; Kush, P. *Phys. Rev.*, **1938**, 53, 318; **1939**, 55, 526-535.

⁴ Bloch, F. *Phys. Rev.*, **1946**, 70, 460-474.

⁵ Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V. *Phys. Rev.*, **1948**, 73, 679-712.

descubierto la gran potencialidad de esta técnica como herramienta de elucidación estructural. Sin embargo, su aplicación inicial estaba limitada al estudio de disoluciones de moléculas pequeñas y en elevadas concentraciones, debido a la baja sensibilidad del fenómeno.

Una de las mayores contribuciones a la RMN moderna fue realizada por el químico suizo Richard R. Ernst en 1966, quien descubrió que estimulando todos los espines con pulsos de radiofrecuencia cortos e intensos, en el mismo espacio de tiempo, la sensibilidad de la técnica podía ser incrementada drásticamente. La excitación simultánea permite que los núcleos emitan una señal en función del tiempo, que contiene información sobre todas las frecuencias de resonancia. Esta puede ser convertida en una señal en el dominio de las frecuencias aplicando un algoritmo matemático conocido como la Transformada de Fourier (TF)⁶. A partir de este momento y con la introducción de los ordenadores, fue posible realizar varias veces el mismo experimento y que sus señales se sumaran o promediaran para finalmente dar lugar a un espectro de RMN de mayor intensidad. De esta manera se amplió el rango de núcleos susceptibles de ser estudiados mediante esta técnica, como por ejemplo, isotopos químicamente interesantes, pero de baja abundancia natural, como el ^{13}C y el ^{15}N .

El científico belga Jean Jeener en una conferencia en 1971 concibió por primera vez la idea de expandir en dos dimensiones la información contenida dentro de un experimento monodimensional de RMN.⁷ Sin embargo, fueron Richard R. Ernst (ETH de Zúrich) y sus colaboradores quienes entre los años 1975-1976, desarrollaron de manera más rigurosa el concepto de la RMN bidimensional (RMN 2D) e introdujeron las primeras aplicaciones.⁸ Por todo ello, Ernst fue galardonado con el premio Nobel de química en 1991 y sus importantes contribuciones sentaron las bases para el desarrollo de la espectroscopía de RMN de alta resolución.

Sin embargo, en sus inicios la RMN 2D no gozaba de gran aceptación en comparación con los experimentos monodimensionales, dadas las limitaciones tecnológicas en los espectrómetros y los sistemas de recogida de datos existentes hasta ese momento. No fue hasta la década de los años 80 cuando la RMN tuvo un impacto realmente significativo dentro de la química, gracias a la

⁶ Ernst, R.R.; Anderson, W.A. *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93-102.

⁷ Jeener, J. Ampere International Summer School II, Basko Polje, Yugoslavia, 1971, (no publicado).

⁸ Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.

acción sinérgica de campos magnéticos más intensos y estables generados por imanes superconductores y ordenadores capaces de realizar cálculos complejos.

Durante esta década se desarrollaron nuevas y sofisticadas secuencias de pulsos de experimentos homo y heteronucleares, espectroscopía *J*-resuelta y excitaciones selectivas entre otras, que permitieron obtener mayor información estructural acerca de procesos de intercambio químico y topológico. Es entonces cuando se inicia el estudio de moléculas más complejas introduciendo nuevas posibilidades para la técnica.

De hecho, en el año 2002 fue otorgado el premio Nobel de química a Kurt Wütrich (ETH de Zurich) por su trabajo, a comienzos de la década de los 80, de aplicación de la RMN a la elucidación estructural de proteínas. Wütrich desarrolló procedimientos generales de asignación sistemática de ciertos elementos en la macromolécula y de determinación de las distancias entre ellos a partir del Efecto Overhauser Nuclear (NOE). Empleando esta información y con la ventaja de que la RMN permite analizar las proteínas en solución, es decir, en un medio ambiente similar al de la célula viva, se pudo proponer su estructura tridimensional.^{9,10}

La evolución de los diferentes métodos de pulsos continuó a lo largo de la década de los 90. Las secuencias de pulsos que introducen los gradientes de campo magnético se convirtieron en herramientas de rutina, dando lugar a espectros de mayor calidad y en menores tiempos. Asimismo, se desarrollaron métodos analíticos combinados con la RMN, como por ejemplo la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC-RMN).

La RMN también ha sido aplicada a la obtención de imágenes, dando lugar a la denominada Imagen de Resonancia Magnética (IRM), que empezó a ser desarrollada en el año 1978 por Paul Lauterbur (Universidad Estatal de New York) y Peter Mansfield (Universidad de Nottingham). Se basa en la idea de que un núcleo absorbe y emite ondas de radio a diferentes frecuencias dependiendo de la intensidad del campo magnético en el que se encuentre. Por tanto, aplicando a la muestra variaciones de campo en diferentes direcciones, se logra que a cada posición en el espacio le corresponda una frecuencia de resonancia

¹⁰ Braun, W.; Bösch, C.; Brown, L.R.; Go, N.; Wüthrich, K. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1981**, 667, 377-396.

diferente. El análisis de las frecuencias de las señales de RMN resultantes proporcionará información de la posición y de la densidad nuclear correspondiente.¹¹ Peter Mansfield desarrolló formas eficientes para adquirir dichas señales de RMN y construir imágenes.¹² Esta aplicación ha representado un gran avance para el diagnóstico médico y la investigación clínica, por lo cual estos dos científicos fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina del año 2003.

La RMN hoy en día:

En vista de la amplia variedad de experimentos que hoy en día están disponibles dentro de la RMN, pareciera que no hay lugar para nuevos desarrollos. Sin embargo, se siguen realizando grandes progresos en el hardware, como por ejemplo en la construcción de sondas criogénicas altamente sensibles que mejoran apreciablemente la relación señal/ruido (S/R) de los experimentos. También en la miniaturización de aquellas, reduciendo la cantidad de muestra requerida e incluso en el blindaje eficiente de los campos magnéticos intensos, que permiten trabajar en espacios cada vez más reducidos.

Hoy en día, la espectroscopía de RMN es una técnica avanzada metodológica y tecnológicamente hablando, que permite investigar la estructura y la dinámica de la materia de un modo no invasivo y estudiar las propiedades moleculares y las interacciones con un detalle sin precedentes.

El reto de estudiar sistemas cada vez más complejos ha incentivado el desarrollo de nuevos métodos de RMN que permitan superar algunos inconvenientes inherentes de la técnica. Quizás la mayor desventaja sea el largo tiempo experimental requerido para llevar a cabo los experimentos multidimensionales, lo cual puede requerir desde minutos hasta muchos días.

Por ello, en los años 2000 y lo que va de esta reciente década, se han dirigido muchos esfuerzos al desarrollo de diferentes métodos rápidos de RMN. Entre ellos, la espectroscopía de RMN Ultrarrápida (UF-NMR)¹³ constituye una de las alternativas más eficientes en cuanto a la reducción del tiempo de adquisición. Esta novedosa metodología emplea un original método de excitación y

¹¹ Lauterbur, P.C. *Nature* **1973**, 242, 190-191.

¹² Garraway, A.N.; Granell, P. K.; Mansfield, P., *J. Phys. C*. **1974**, 7, 457-426.

¹³ Felli, I.; Brutscher, B. *ChemPhysChem.*, **2009**, 10, 1356-1368.

procesado que permite la obtención de espectros bidimensionales en tiempos del orden de segundos. Ello ha abierto toda una serie de posibles aplicaciones de la RMN, como por ejemplo la detección y seguimiento de especies reactivas o el estudio de procesos dinámicos rápidos. Entre ellos se encuentran ciertas conversiones de reactivos a productos, como son las reacciones orgánicas, o el intercambio de protones lábiles por deuterio. También en aplicaciones analíticas, como la aparición de un determinado producto en la elución de una columna cromatográfica, o la relajación de un núcleo tras una perturbación instantánea.

Esta memoria tiene como objetivo la aplicación de diferentes secuencias de UF-NMR al estudio en tiempo real de diferentes reacciones orgánicas, permitiendo con ello esclarecer los mecanismos por los cuales estos procesos transcurren y obtener adicionalmente datos cinéticos de algunos de ellos.

II. Antecedentes

II.1. Características de la RMN clásica^{14, 15}

La Resonancia Magnética Nuclear es una técnica espectroscópica de absorción no destructiva, que se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Algunos átomos (aquellos que tienen un número cuántico de espín I , diferente de cero, como por ejemplo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{23}Na , ^{27}Al , ^{31}P , ^{29}Si) poseen un espín nuclear resultante, el cual va asociado a un momento magnético μ (Figura II.1, a), permitiendo con ello, que sean observables a través de la RMN. Este momento magnético es una magnitud vectorial por lo que puede adoptar diferentes orientaciones.

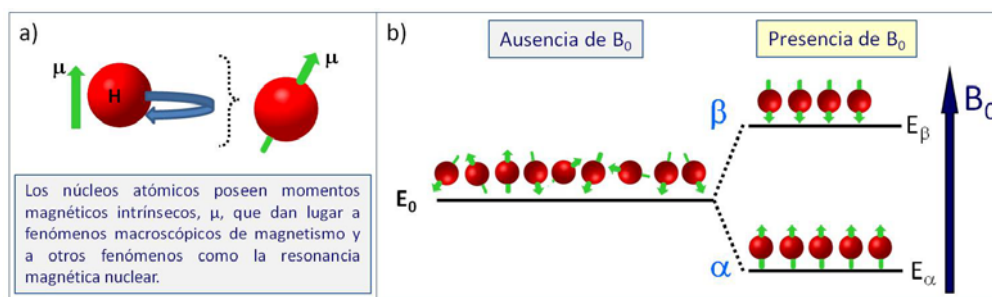


Figura II.1. a) Se consideran los átomos como pequeños imanes, con un vector momento magnético μ inherente. b) Disposición de los espines nucleares en ausencia y presencia de un campo magnético externo (B_0).

Cuando estos núcleos atómicos son sometidos a un campo magnético externo B_0 , los espines nucleares se comportan como pequeños imanes microscópicos, en donde unos se alinean con el campo magnético y otros en sentido contrario (Figura II.1, b), siendo la primera orientación el estado de menor energía.¹⁶ Esta distribución o diagrama de niveles energéticos sigue las reglas de la mecánica cuántica.

La diferencia energética entre estos dos estados es muy pequeña y corresponde al rango de las radiofrecuencias. De modo que, si los núcleos son irradiados con pulsos de ondas de radio, con las características de potencia y duración

¹⁴ Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy*, 2^{da} ed.; John Wiley & Son: Chichester, Inglaterra, 2010.

¹⁵ Claridge, T. D.W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2^{da} ed.; Elsevier: Hungría, 2009.

¹⁶ La energía de interacción entre el momento magnético del espín nuclear y el campo magnético depende del ángulo entre ellos. El nivel de energía más bajo (estado α) se adopta cuando el ángulo es cero, es decir si el momento magnético de espín es paralelo al campo externo. El estado de energía más alto (estado β), se adopta cuando el espín nuclear está dispuesto de manera antiparalela al campo magnético.

adecuadas, podrán inducirse transiciones entre los niveles. Esto es lo que se conoce como el fenómeno de resonancia.

Los espines absorben esta radiación, que posteriormente será devuelta al medio a través de procesos de relajación hasta volver al estado de equilibrio. Las frecuencias de esta emisión se corresponden con el campo magnético inducido en el núcleo por su entorno, por tanto, contienen información de la estructura, la configuración y la dinámica de las moléculas, permitiendo identificar la composición de las sustancias químicas en líquidos y sólidos.

El esquema general para un experimento RMN monodimensional (RMN 1D), consiste en primer lugar en una fase de preparación, que es un tiempo de espera, conocido también como tiempo de recuperación, en el que se procura que el vector magnetización M (la resultante de todos los espines nucleares) alcance el estado de equilibrio, es decir, se encuentre totalmente dispuesto en la dirección del eje \hat{z} . A continuación, se aplica un pulso de radiofrecuencias (RF), generalmente de 90° , con lo que se consigue desplazar el vector magnetización al plano $\hat{x}\hat{y}$.

La evolución de la magnetización en el plano $\hat{x}\hat{y}$, produce una señal eléctrica, proporcional a ella,¹⁷ que va disminuyendo con el tiempo, dada su tendencia natural a volver al estado de equilibrio (eje \hat{z}). Se genera por tanto, una curva de inducción o FID, por su nombre en inglés *Free Induction Decay*, la cual pierde intensidad con el tiempo. Esta señal se adquiere durante un intervalo t_2 , conocido también como tiempo de adquisición. A continuación la señal se somete a un proceso de digitalización y almacenamiento. Esta situación se repite el número de veces que sea necesario hasta alcanzar una FID acumulada con la intensidad o relación S/R suficiente.

La señal obtenida depende del tiempo, $f(t_2)$. Sin embargo, para obtener el espectro es necesario convertirla en una señal dependiente de las frecuencias que permita extraer la información espectroscópica, $f(\nu_2)$. Para ello se aplica un algoritmo matemático conocido como la transformada de Fourier (TF), lo que da lugar finalmente a un espectro de RMN 1D. En la Figura II.2 se ilustra este proceso.

¹⁷ La componente del vector de magnetización M paralela al campo magnético principal B_0 , se denomina **magnetización longitudinal** o M_z y **magnetización transversal** o M_{xy} , a la componente del vector magnetización M perpendicular al campo magnético principal B_0 .

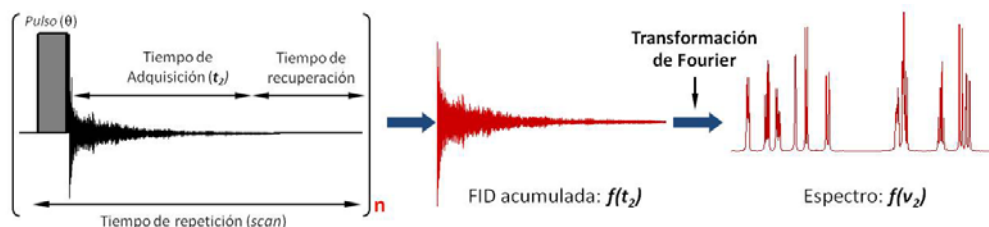


Figura II.2. Esquema básico de la RMN 1D, en donde se observa un pulso de RF de excitación, la etapa de adquisición de la FID y la de recuperación. El conjunto constituye lo que se denomina *scan*. El tiempo total o suma de todos estos elementos constituye el tiempo de repetición. Cada *scan* será acumulado n veces hasta alcanzar la S/R adecuada. A la señal obtenida en función del tiempo $f(t_2)$, se le aplica la transformada de Fourier, dando lugar a una señal en función de la frecuencia, $f(\nu_2)$.

Un espectro de RMN 1D típico, cubre el rango de frecuencias (en Hz o ppm) de los núcleos que están siendo observados. Estudiando detalladamente las propiedades de las señales de resonancia, es posible conocer características intrínsecas de la naturaleza química de las moléculas estudiadas, por ejemplo: la **posición** (desplazamientos químicos o frecuencias) es determinada por el ambiente químico del núcleo, dando información de los grupos funcionales presentes.

Los desdoblamientos o **estructura fina** de las señales son producto de la interacción con los núcleos vecinos que posean momento magnético. Estos acoplamientos espín-espín pueden tener lugar entre núcleos del mismo tipo (homonucleares) o entre núcleos de elementos diferentes (heteronucleares). Existen dos tipos de acoplamientos: escalares, que se producen a través de los enlaces (su valor en Hz se denomina constante de acoplamiento, $J_{A,X}$) y dipolares, que ocurren a través del espacio. Ambos ofrecen información sobre la estructura molecular como los enlaces químicos, la hibridación de los átomos, las longitudes y ángulos de enlace, ángulos torsionales, los tipos de sustituyentes que posea la molécula o la presencia de pares de electrones no compartidos.

La **magnitud** de cada señal (intensidad o integral) proporciona información de la abundancia relativa de los núcleos considerados y finalmente, la **anchura de línea** proporciona información sobre los acoplamientos a larga distancia y sobre

los tiempos de relajación T_1 y T_2 , que están relacionados con los movimientos intramoleculares de los sistemas estudiados.^{18,19}

Toda esta información contenida en el espectro, permite que sea posible elucidar de manera directa la estructura de determinadas moléculas, tal como se observa en la Figura II.3 para la estricnina. Sin embargo también es frecuente obtener espectros 1D en los que, dada la concentración masiva de señales, es casi imposible extraer información útil, que es lo que se observa para la flavodoxina en la Figura II.4. Este fenómeno se va haciendo más acusado a medida que aumenta el tamaño y la complejidad de los sistemas estudiados. Particularmente, la resolución que se obtiene con la RMN 1D en las moléculas de origen biológico suele ser muy baja.

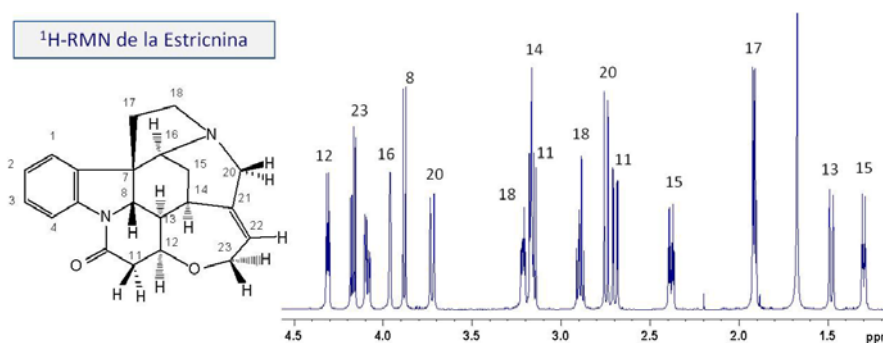


Figura II.3. La estricnina es un alcaloide con actividad neurotóxica y se utiliza con frecuencia como muestra patrón en el desarrollo de secuencias de pulsos. A la derecha se observa parte de su espectro de ^1H -RMN, que permite elucidar su estructura de manera directa.

¹⁸ Giménez, J.J.; Expósito, J.M. *RMN para Químicos Orgánicos*, Universidad de Almería, Almería, 1998.

¹⁹ Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., versión española: Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Söllhuber, M., *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Síntesis S.A., Madrid, 2005.

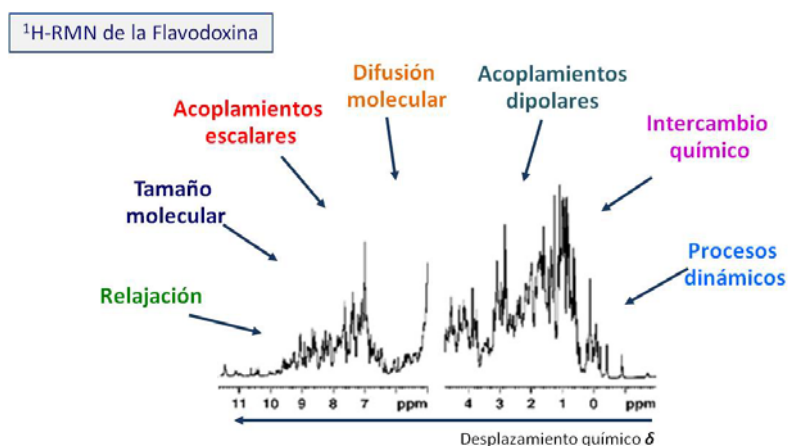


Figura II.4. Espectro de ^1H -RMN de la proteína bacteriana flavodoxina. En él se aprecia una gran complejidad, la cual se debe a diferentes factores como los que se señalan en el esquema.

La RMN bidimensional (RMN 2D) nace como consecuencia del interés en resolver el problema de la falta de resolución espectral en los experimentos monodimensionales complejos. Los primeros experimentos en RMN 2D fueron propuestos por J. Jeener²⁰ a principio de los años 70 y desarrollados por R.R. Ernst y sus colaboradores a finales de la misma década.²¹ Consiste básicamente en dispersar los datos de RMN en dos dimensiones, simplificando la apariencia de los mismos. Si bien es cierto que la resolución espectral mejora a medida que se implementan los experimentos en espectrómetros de mayor intensidad de campo externo, esto no siempre resuelve el problema.

En la RMN 2D, es necesario muestrear los datos en función de dos variables de tiempo diferentes. La primera continúa siendo el tiempo de detección habitual en los experimentos RMN-1D, t_2 . La segunda es una nueva variable temporal t_1 , denominada tiempo de evolución. De esta manera los experimentos de RMN 2D se basan en la adquisición de experimentos sucesivos de RMN 1D, en los que t_1 es incrementado de manera secuencial en cada uno de ellos. Por tanto la FID obtenida dependerá de dos variables temporales t_1 y t_2 , que tras la aplicación de la transformada de Fourier dará lugar a un espectro bidimensional en función de dos variables en el dominio de las frecuencias, $f(\nu_1, \nu_2)$.

²⁰ Jeener, J. Ampere International Summer School II, Basko Polje, Yugoslavia, **1971**, (no publicado).

²¹ Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.*, **1976**, *64*, 2229-2246.

Una forma general de representar un experimento de RMN 2D se muestra en la Figura II.5. Consiste en cuatro etapas diferentes, la primera de ellas llamada **Preparación**, durante la cual se aplican uno o varios pulsos de RF, consiguiendo con ello, excitar los espines y desplazar la magnetización resultante al plano $\hat{x}\hat{y}$. Esta se desarrolla en la siguiente etapa denominada periodo de **Evolución** durante el tiempo t_1 .

La siguiente etapa es conocida como periodo de **Mezcla** y determina la información que contendrá el espectro final. Los elementos que la conforman pueden variar, desde un simple pulso de 90° hasta un esquema más complejo de varios pulsos y tiempos entre ellos. En ella la magnetización resultante de la etapa de evolución se convierte en una señal observable, que por tanto puede ser adquirida en función de la segunda variable de tiempo t_2 , durante la última etapa denominada de **Detección**.

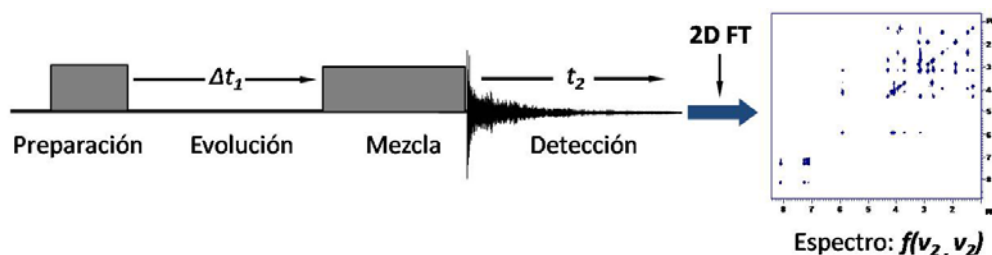


Figura II.5. Esquema general para la espectroscopía de RMN 2D. Tras la preparación se introduce la etapa de evolución caracterizada por un tiempo t_1 . Le sigue una etapa de mezcla que varía según el experimento deseado, tras la cual se adquiere la señal durante el tiempo t_2 , de manera análoga al experimento RMN 1D. La secuencia se repite cada vez con un incremento secuencial en el valor de t_1 . Finalmente, a estos datos se les aplica una doble transformada de Fourier, dando lugar a un espectro que depende de dos variables en el dominio de frecuencias $f(v_1, v_2)$.

Esta sucesión de eventos es lo que se conoce como secuencia de pulsos. La naturaleza exacta del periodo de mezcla determinará la interacción y/o información que se obtendrá en el espectro 2D. Existen secuencias de pulsos de RMN 2D homonucleares, en donde las dos dimensiones corresponden al mismo núcleo, pero también se pueden utilizar canales de radiofrecuencia simultáneos, cada uno trabajando a la frecuencia de resonancia de un núcleo diferente y estaremos entonces hablando de un experimento de RMN 2D heteronuclear. En química orgánica se desean conocer en muchas ocasiones las conexiones directas existentes entre el ^1H (protón) y el ^{13}C , pero también otras que puedan ofrecer los experimentos de correlación directa e indirecta entre otros núcleos

como ^1H , ^{15}N , ^1H , ^{31}P o incluso ^{31}P , ^{13}C . No es un secreto que núcleos como el ^{13}C y el ^{15}N poseen una abundancia natural y una sensibilidad individual bajas para la RMN y por ello, proporcionan bajas intensidades de señal. Debido a esto, en las secuencias de pulsos heteronucleares y teniendo como base el principio de transferencia de polarización,²² se emplea el núcleo sensible (^1H , I) para efectuar la observación del heteronúcleo menos sensible (S).

Hoy en día la aplicación de secuencias de pulsos homonucleares como el 2D COSY (*Correlated Spectroscopy*) ó heteronucleares como el 2D HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) para resolver un problema de elucidación estructural, es rutinaria, ya que son experimentos fiables y fáciles de interpretar, lo que explica su popularidad. No cabe duda que la introducción de la RMN 2D ha hecho que la determinación estructural sea mucho más fácil, permitiendo abordar problemas cada vez más complejos. Incluso, cuando las dificultades de solapamiento o congestión de señales persisten en la RMN 2D, en los espectrómetros modernos se puede recurrir a una dimensionalidad superior mediante la RMN 3D, 4D, etc. con el fin de alcanzar una resolución adecuada.

En los experimentos multidimensionales, las $n-1$ dimensiones indirectas se nombran como t_1 , t_2 hasta t_{n-1} y la dimensión directa se etiqueta como t_n , por ejemplo, para un experimento de RMN 3D, se tiene t_1 y t_2 para las dimensiones indirectas y t_3 para la directa.

²² Núcleos como el ^{13}C y el ^{15}N poseen pequeñas diferencias de población entre sus estados nucleares fundamental y excitado, razón por la cual proporcionan bajas intensidades de señal. A través de la transferencia de polarización se consigue transmitir la superior diferencia de población existente en un núcleo más sensible (^1H), a otro menos sensible (^{13}C o ^{15}N), dando lugar a que las transiciones del núcleo poco sensible se aumenten y con ello, la intensidad de su señal.

II.2. Secuencias rápidas de RMN

El tiempo necesario para adquirir un espectro multidimensional está limitado por la **resolución digital** ($\Delta_{señal}$) y la **sensibilidad** (relación S/R) deseadas. Para entender esta dependencia, es necesario tener claro cómo se obtiene un experimento de RMN nD.

En la RMN multidimensional, una de las dimensiones se adquiere de manera convencional (directa) y las n-1 dimensiones restantes son medidas de forma indirecta. Así, es necesario ejecutar N_1 veces el esquema general completo, constituido por las etapas de Preparación-Evolución-Mezcla-Detección (Figura II.5), o dicho de otra manera, se requiere la adquisición de N_1 espectros 1D. Tal y como se observa en la Figura II.6, que representa el esquema general para la RMN 2D, en cada uno de estos pasos el tiempo de evolución t_1 es incrementado de manera sistemática. Para cada incremento de t_1 (Δt_1), que va desde 0 hasta t_1^{max} , se ejecuta la secuencia de pulsos, la FID obtenida se digitaliza a intervalos regulares en función de t_2 y la señal en el dominio del tiempo es almacenada, para su posterior acumulación y transformación.

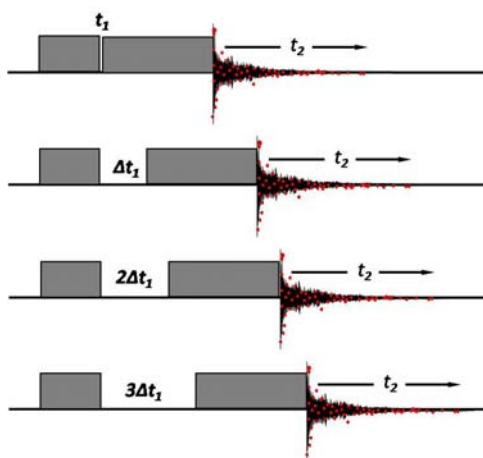


Figura II.6. En un experimento de RMN 2D una de las dimensiones se adquiere de forma habitual en función de t_2 y la dimensión restante es obtenida indirectamente, mediante la adquisición de N_1 espectros 1D, en los que ocurre un incremento paramétrico de t_1 . Los datos adquiridos con cada valor de t_1 son digitalizados y posteriormente almacenados, entonces se convierten en una serie de puntos que representan los distintos instantes de esta evolución.

Esto se lleva a cabo, con el fin de obtener el número de incrementos en t_1 suficientes para construir la dimensión indirecta y así medir adecuadamente las frecuencias presentes en ella (**resolución digital**). Por otro lado y con el fin de

maximizar la respuesta de cada experimento obtenido con diferente valor de t_1 , se dispone de un tiempo de espera entre ellos. Esto permite a la magnetización recuperar la situación de equilibrio inicial a través de la relajación longitudinal, que se caracteriza por un tiempo T_1 .

Si se considera la distribución de tiempos necesarios para obtener la señal de RMN, se aprecia (Figura II.7) cómo, tras la etapa de aplicación de la secuencia de pulsos, con una aproximación media de milisegundos, se encuentra la adquisición de la FID. La duración conjunta de ambas etapas es aproximadamente de 0,8 - 1,0 segundos. A partir de ese momento se hace necesario esperar que se produzca la relajación longitudinal, la cual depende de las moléculas estudiadas. En sistemas favorables ello supone 1 - 2 segundos.

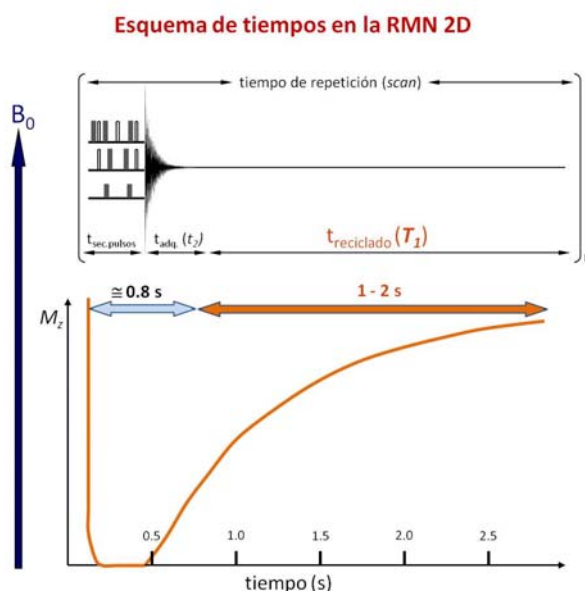


Figura II.7. El esquema representa los tiempos requeridos para la RMN 2D dentro de cada uno de los incrementos o pasos con un valor de t_1 específico. La mayor parte del tiempo se invierte en la relajación longitudinal.

Es importante resaltar que la dimensión directa (función de t_2) se construye a partir del número de puntos recogidos en la FID, lo cual se lleva a cabo de manera convencional, es decir, ocurre en tiempo real. Esto implica que llevar a cabo un muestreo suficiente de esta dimensión (directa), no requiere demasiado tiempo adicional, en comparación con el tiempo que necesita el muestreo en la dimensión indirecta.

En ocasiones la relación S/R deseada (**sensibilidad**) también puede limitar el tiempo necesario para adquirir un espectro multidimensional (nD). Cuando existen problemas de muestras diluidas o poco sensibles, se adquieren tantas FIDs como sea necesario (*scans*) hasta obtener una relación S/R adecuada, ya que, aunque en cada uno de ellos dicha relación parezca insuficiente, su posterior acumulación contribuye a la mejora de este aspecto en el experimento multidimensional. Sin embargo, la disponibilidad de campos magnéticos cada vez más intensos y la introducción de las crio-sondas, hacen que la sensibilidad deje de ser, a menudo, un elemento determinante en el tiempo de medida.²³

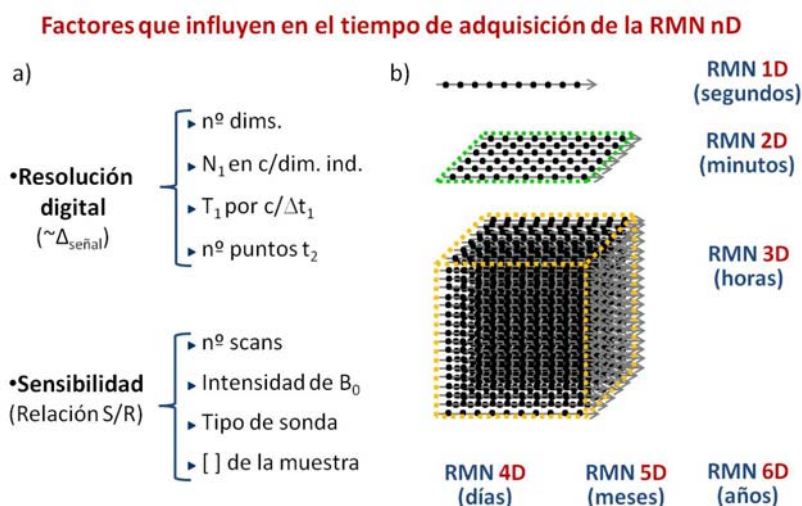


Figura II.8. (a) El tiempo de adquisición de la RMN dependerá de la resolución espectral y de la relación S/R deseada, representado en el número de acumulaciones. (b) El tiempo de adquisición crece de manera exponencial con la dimensionalidad.

La cohesión de todos estos factores, tiene como consecuencia la necesidad de largos tiempos de adquisición, el cual, como se resume en la Figura II.8, crece de manera exponencial con el aumento de la dimensionalidad de los experimentos, necesitando incluso hasta varios días. Esto trae consigo el que sea casi imposible la aplicación de la RMN tradicional en ciertos casos como en la monitorización de procesos dinámicos que ocurran en escalas de tiempo reducidas, o la caracterización de especies con tiempos de vida cortos, entre otros.

²³ Pons, M. *Métodos Rápidos de Adquisición de Espectros de RMN*, Curso Jaca, GERMN, 2009.

A pesar de que la velocidad sigue siendo el principal inconveniente en la espectroscopía de RMN nD, hoy en día es posible su implementación en la caracterización y seguimiento de procesos dinámicos, denominándose RMN de tiempo real (ver apartado II.5).

Durante la última década se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de nuevos esquemas para la adquisición de datos que permitan la reducción del tiempo necesario en la obtención de los experimentos en la RMN. Sin embargo, estas medidas han implicado llegar a un compromiso entre rapidez y resolución (siempre inferior a la óptima), prescindir del ciclado de fases y por tanto permitir ciertos artefactos, o aceptar el doblado de señales, si ello puede ser tolerado, tal como veremos detalladamente en las siguientes secciones.

Afortunadamente, ahora es posible, el estudio de procesos que tiene lugar en escalas de tiempo reducidas, como puede ser el plegamiento de proteínas, el seguimiento de especies de tiempos de vida cortos, las conversiones rápidas de reactivos en productos, el intercambio químico de biomoléculas poco estables, la aparición de un determinado producto en la elución de una columna cromatográfica, o el uso de estados metaestables de los espines, tales como los que se producen en los procesos de hiperpolarización.

En general, estas nuevas técnicas rápidas pueden ser divididas en cuatro categorías principales: i) métodos de muestreo reducido, que limitan el número de puntos adquiridos para construir la dimensión indirecta, ii) métodos de pulsado rápido, basadas en la optimización del tiempo de cada uno de los pasos, iii) técnicas de tiempo compartido en las que se reduce el tiempo experimental adquiriendo diferentes experimentos de RMN nD en paralelo y finalmente iv) la espectroscopía de RMN ultrarrápida (UF-NMR), la cual toma principios de la IRM para la codificación y decodificación de las señales, acortando drásticamente los tiempos de adquisición de estos experimentos.^{24,25} Esta estrategia es la base espectroscópica de esta memoria, razón por la cual se le dedica todo un apartado.

²⁴ Rennella, E.; Brutscher, B. *ChemPhysChem.*, **2013**, *14*, 3059-3070.

²⁵ Webb, G.; Maciejewski, M.; Stern, A.; King, G.; Hoch, J. Nonuniform Sampling in Biomolecular NMR. En *Modern Magnetic Resonance*, Springer, Netherlands, 2006, 1305-1311.

II.2.1 Técnicas de muestreo reducido

Esta estrategia se fundamenta en optimizar el número de repeticiones de la secuencia de pulsos básica que se requieren para muestrear la dimensión indirecta y con ello lograr una disminución proporcional del tiempo necesario para adquirir el experimento. La Figura II.9 ilustra algunas de las diferentes estrategias de muestreo empleadas y las compara con el esquema de empleado en la RMN 3D tradicional.

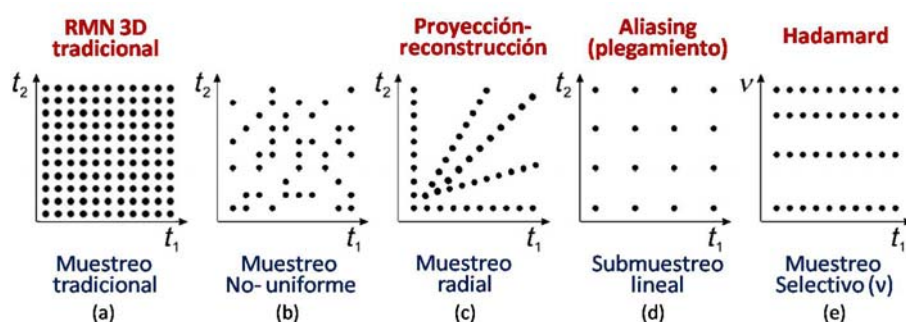


Figura II.9. Esquema comparativo entre las diferentes técnicas de muestreo de las dimensiones indirectas (t_1 , t_2) empleadas en la adquisición rápida de espectros de RMN 3D; a la izquierda se representa el muestreo requerido para la RMN tradicional.

II.2.1.1 Muestreo no-uniforme y radial

El método de muestreo reducido no-uniforme se basa en la adquisición de puntos en las diferentes dimensiones indirectas (t_1 , t_2 ,...) de manera aleatoria (Figura II.9 b). Generalmente se adquieren entre el 10 y el 30% de los puntos, lo que reduce el tiempo de adquisición. Estos experimentos no pueden procesarse mediante la transformada de Fourier y se requieren otros procedimientos de procesamiento para reconstruir el espectro de RMN nD, como el método de reconstrucción de máxima entropía²⁶ o el método de filtrado por diagonalización.²⁷ En la práctica, requieren de un procesamiento laborioso, del empleo de algoritmos de cálculo complicados que además no son tan robustos y fiables como la Transformada de Fourier y de ajustes de parámetros que necesitan del conocimiento previo del sistema estudiado o bien mediante un proceso de ensayo y error.

²⁶ Rovnyak, D.; Filip, C.; Itin, B.; Stern, A.S.; Wagner, G.; Griffin, R.G.; Hoch, J.C. *J. Magn. Reson.*, **2003**, 161, 43-55.

²⁷ Chen, J.H.; Nietlispach, D.; Shaka, J.A.; Mandelshtam, V.A. *J. Magn. Reson.*, **2004**, 169, 215-224.

Otra alternativa para realizar un muestreo reducido de la dimensión indirecta es el muestreo radial, el cual se basa en el incremento simultáneo de varios tiempos de evolución, por ejemplo t_1 y t_2 para un espectro 3D (Figura II.9 c). Esto permite la adquisición de una cantidad restringida de planos de proyección, cada uno obtenido con diferentes ángulos, con los cuales se pueden reconstruir los espectros nD.²⁸ Por ello, esta técnica es conocida como RMN de Proyección-Reconstrucción.

Los datos que se obtienen poseen una dimensión reducida, pues son, en el caso de un experimento 3D, las proyecciones 2D del espectro total. Para recuperar la información, es necesaria la aplicación de técnicas de retroproyección o de procedimientos de reconstrucción algebraica.²⁹ En esta técnica se emplea la Transformada de Fourier para su procesado. La RMN de Proyección-Reconstrucción, permite una disminución del tiempo de adquisición de varios órdenes de magnitud, particularmente en los espectros de RMN 4D o superiores. Recientemente se ha aplicado este método al estudio y asignación estructural de proteínas solubles no globulares, de más de 150 residuos, adquiriendo experimentos de RMN desde 5 hasta 7 dimensiones.³⁰

II.2.1.2 Submuestreo lineal (espectros plegados)

Este es un procedimiento complementario para los diferentes métodos rápidos diseñados y busca incrementar la densidad de señales en un rango espectral determinado sin perder información y reduciendo por tanto el tiempo de adquisición de los experimentos de RMN nD. Para ello es necesario un conocimiento previo de las frecuencias del sistema de espines estudiado (mediante espectros tradicionales adquiridos con antelación).

Mediante esta técnica se aumenta el tiempo de espera entre los diferentes puntos contiguos a muestrear a lo largo de la dimensión indirecta (*dwell time*), de forma que el intervalo entre los puntos sea mayor al necesario. Debido a ello, existe un déficit de muestreo en el dominio del tiempo, que genera, no solo que el tiempo de adquisición sea menor, sino que se produzca una violación del teorema de Nyquist.³¹ Es decir, esta disminución de muestreo en el dominio del

²⁸ Kupče, E.; Freeman, R. J. *Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6429-6440.

²⁹ Kim, S.; Szyperki, T. J. *Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1385-1393.

³⁰ Hiller, S.; Wasmer, C.; Wider, G.; Wüthrich, K. J. *Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10823-10828.

³¹ El teorema de Nyquist establece que para realizar una reconstrucción exacta de una señal periódica como lo es la respuesta procedente de la RMN, es necesario que el muestreo se realice a una velocidad tal que

tiempo es equivalente a una reducción aparente del rango espectral de esa dimensión indirecta (SW_1) y del número de incrementos (N_1) que deben ser llevados a cabo con el fin de obtener una determinada resolución espectral $\Delta\nu_1$, según la relación $N_1 = SW_1 / \Delta\nu_1$. Ello trae como consecuencia un efecto de plegamiento de las señales dentro del espectro conocido como *aliasing*.

La ventaja que supone este método radica en que la resolución espectral se mantiene, ya que el valor de t_1^{max} que se muestrea no cambia. La sencillez del método lo ha hecho atractivo para muchas aplicaciones de rutina en la que se dispone de algún conocimiento previo de los desplazamientos químicos.

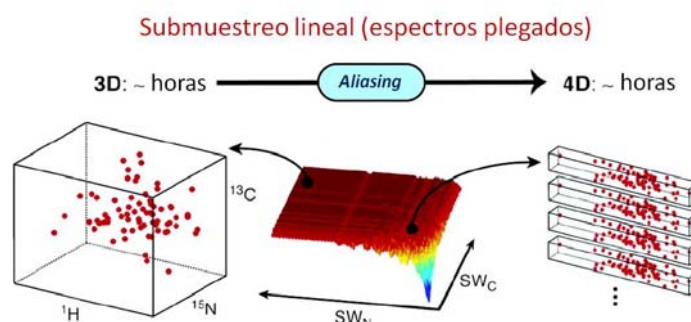


Figura II.10. A partir del conocimiento previo de las frecuencias de los sistemas de espines estudiados es posible optimizar la densidad de señales mediante un plegamiento controlado de ellas en un experimento de RMN 4D y lograr un tiempo de adquisición similar al de un experimento de RMN 3D

Con la técnica de compresión espectral automática ASCOM, basada en la estrategia de submuestreo lineal, es posible obtener un experimento 4D HNCO-CACB en menos de 4 horas para una muestra de ubiquitina 2mM, cuando de manera tradicional este experimento podría requerir un tiempo de adquisición aproximado de una semana.³²

permite obtener los puntos suficientes para no perder características importantes de la onda e impedir que los puntos digitalizados sean una representación pobre de la misma. De ahí que el intervalo entre puntos Δ (*dwell time*) no deba exceder el siguiente criterio $\Delta = 1/2f_{max}$, donde f_{max} es la frecuencia máxima que va a ser observada. Desde un punto de vista práctico, ello supone que en el muestreo, se han de utilizar al menos, dos puntos por ciclo. Si el criterio no se cumple, existirán frecuencias cuyo muestreo coincide con otras (el llamado *aliasing*), produciendo el solapamiento accidental de correlaciones y dando lugar por tanto, a una asignación errónea.

³² Lescop, E.; Schanda, R.; Rasia, R.; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 2756-2757.

II.2.1.3 Muestreo selectivo (espectroscopía de Hadamard)

A diferencia de la RMN tradicional, en donde todas las frecuencias se excitan simultáneamente mediante un pulso no selectivo (correspondan o no a una señal en el espectro) y haciendo con ello, menos eficaz la técnica; la espectroscopía de Hadamard se basa en la excitación selectiva y simultánea de un número limitado de frecuencias empleando una modulación de fase diferente para cada una de ellas, lo cual permite la extracción por separado de sus contribuciones individuales.³³

La excitación selectiva cobra interés cuando existe un número reducido de señales que contienen la información deseada y se requiere obtener por separado los datos correspondientes a dichas frecuencias. Sin embargo, esto implica adquirir un experimento 1D exploratorio o disponer de un conocimiento previo del sistema estudiado y por supuesto, solo podrá ser observada la región espectral de interés.

La clave de este método radica en que toda la información de la muestra obtenida (desplazamientos químicos, acoplamientos espín-espín, entre otros) se codifica y descodifica de acuerdo con las denominadas matrices de Hadamard de tamaño $n \times n$, las cuales no se enfocan en la información periódica de las señales (senos y cosenos), sino en sus amplitudes (representadas por +1 y -1). El orden n de la matriz corresponde al número de frecuencias seleccionadas. Todo ello supondrá un ahorro de tiempo experimental siempre que el número de dichas frecuencias n , sea inferior al número de puntos que se muestrean a lo largo de la dimensión indirecta en la espectroscopía convencional.

Esta metodología se ha empleado con buenos resultados en la obtención de espectros multidimensionales de RMN de proteínas y ácidos nucleicos.^{34,35} Así mismo, Bougault y colaboradores³⁶ demostraron que con una versión de la secuencia 2D HMQC codificada mediante la técnica de Hadamard, es posible la cuantificación de la constante de velocidad del intercambio de $^1\text{H}/\text{D}$ amídico de la ubiquitina.

³³ Kupče, E.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.*, **2003**, 162, 300-310.

³⁴ Lescop, E.; Rasia, R.; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5014-5015.

³⁵ Van Melckebeke, H.; Simorre, J.P.; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9584-9591.

³⁶ Bougault, C.; Feng, L.; Glushka, J.; Kupče, E.; Prestegard, J.H. *J. Biomol. NMR.*, **2004**, 28, 385-390.

II.2.2 Técnicas de pulsado rápido

Como se ha observado en la Figura II.7, la mayor parte del tiempo de adquisición se invierte en el periodo de relajación de los núcleos excitados al estado de equilibrio, lo que implica importantes tiempos de espera entre *scans*. Por ello, esta estrategia se basa en acortar el tiempo necesario entre los diferentes barridos de cada experimento, mediante el empleo de tiempos de espera cortos. Con ello aumenta la velocidad de repetición de la secuencia y hace posible acumular el mayor número de pasos en el menor tiempo posible. La utilización de reactivos de relajación, como p.e. los compuestos de Cr, constituye una alternativa en RMN en estado líquido.³⁷ Por otro lado, ha habido un avance metodológico importante en otras alternativas basadas en el diseño de nuevas secuencias de pulsos que buscan este objetivo. Seguidamente se comentan algunas de las más destacadas:

II.2.2.1 Experimentos SOFAST y BEST

Estas técnicas se basan en la aplicación de pulsos selectivos que exciten exclusivamente los núcleos de interés, en lugar de afectar a toda la muestra. Con ello se busca que los espines excitados, a través de interacciones dipolares, cedan su exceso de energía al resto de núcleos que no han sido perturbados, consiguiendo por tanto, que el fenómeno de relajación longitudinal sea más eficiente. Esto permite la reducción del tiempo entre los diferentes barridos consecutivos que se llevan a cabo durante el experimento. Asimismo, la duración (ángulo) de los pulsos selectivos que se emplean en estas secuencias, se optimiza según la ecuación de Ernst,³⁸ de tal manera que es posible incrementar la velocidad de repetición con mínimas pérdidas de sensibilidad. La unión de estos dos factores produce una disminución importante del tiempo de espera, pasando de los segundos a los milisegundos y finalmente ello se traduce en una reducción importante del tiempo total del experimento.

³⁷ Berger, S.; Braun, S., *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.

³⁸ Ross, A.; Salzmann, M.; Senn, H., *J. Biomol. NMR.*, **1997**, *10*, 389-396.

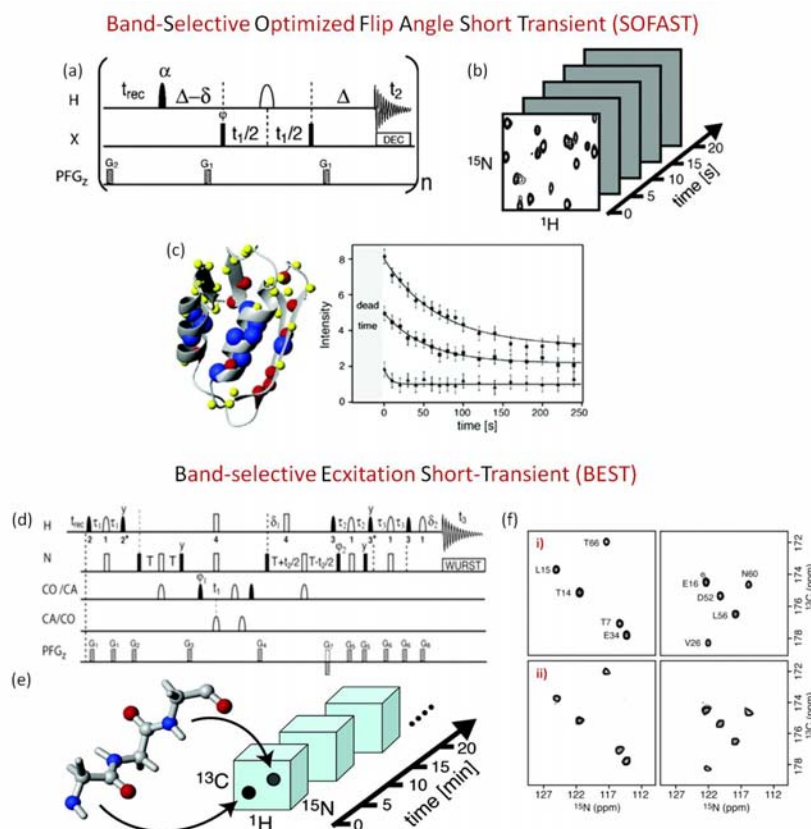


Figura II.11. (a) Secuencia de pulsos del experimento SOFAST. (b) Obtención de un experimento $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ SOFAST-HMQC de la ubiquitina 2 mM, en un tiempo total de 5s, adquirido en un espectrómetro de 800 MHz. (c) Aplicación de la técnica en la medida de la constante de velocidad de intercambio τ_{ex} $^1\text{H}/\text{D}$ de un fragmento de proteína de 67 residuos, MerAa. (d) Secuencia de pulsos del experimento BEST; con esta técnica es posible la obtención de (e) espectros de RMN 3D NHCO y HNCA para diferentes proteínas marcadas con ^{13}C y ^{15}N , en pocos minutos, como se indica en la figura. (f) Planos N-CO i) extraídos de un experimento 3D BEST-HNCO adquirido en 10 min y ii) de un experimento BEST-HCNO, reconstruidos a partir de un conjunto de seis proyecciones 2D, adquiridas en un tiempo de 2 min.

Con el experimento denominado SOFAST (*band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient*), es posible obtener un espectro de RMN 2D de correlación heteronuclear $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ de la ubiquitina 2mM en sólo 5 segundos. Asimismo, es posible medir la velocidad de intercambio τ_{ex} de $^1\text{H}/\text{D}$ a lo largo del esqueleto de un fragmento de una proteína globular pequeña. En general, este fenómeno de intercambio cubre un rango de tiempos muy amplio, que va desde milisegundos hasta días. Con el método SOFAST es posible seguir los intercambios que se den

en tiempos del orden de los segundos. La Figura II.11 (a - c) muestra la secuencia de pulsos y algunas de sus aplicaciones.³⁹

Con el experimento BEST (*Band-selective Excitation Short-Transient*), es posible adquirir experimentos de RMN 3D H-N-CO y 3D H-N-CA de proteínas marcadas con ^{13}C y ^{15}N en pocos minutos. Su registro de manera tradicional puede necesitar desde horas, hasta días. Su secuencia de pulsos, así como alguna aplicación son descritas en la Figura II.11 (d - f).⁴⁰

II.2.3 Técnicas de tiempo compartido

Existen algunas estrategias alternativas para acelerar la adquisición de datos, que hacen posible la obtención de múltiples espectros de RMN mediante la detección simultánea de diferentes vías de coherencia. Estas técnicas no encajan en las dos categorías mencionadas hasta ahora, por lo que se clasifican separadamente. A continuación describiremos algunas de las más relevantes.

II.2.3.1 Espectroscopía de detección en paralelo (PANSY)

Dentro de las estrategias de tiempo compartido se encuentra la adquisición en paralelo PANSY (*Parallel Acquisition NMR Spectroscopy*), la cual se basa en el registro de múltiples FIDs dentro de un mismo barrido. Esta metodología se introdujo hace tiempo como método para la adquisición simultánea de datos de RMN complementarios para el mismo tipo de núcleo estudiado,⁴¹ y hoy en día se ha retomado con la idea de obtener de manera simultánea y en una sola adquisición, dos o más espectros multidimensionales de correlación de diferentes núcleos (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F). Para ello se requiere una sonda con un amplio rango de radiofrecuencias (banda ancha) y un sistema detección con varios receptores, uno por cada especie estudiada.⁴²

La ganancia de tiempo es evidente, como muestra el ejemplo de la Figura II.12 para los espectros H,H-TOCSY y H,C HSQC obtenidos simultáneamente en 20 min, a partir de una muestra de brucina, o para dos espectros simultáneos HSQC, de correlación (^{19}F , ^{13}C) y (^1H , ^{13}C) del 2-bromofenol-3-trifluorometil-5-metilpirazol.

³⁹ Schanda, P.; Brutscher, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 8014-8015.

⁴⁰ Schanda, P.; Van Melckebeke, H.; Brutscher, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9042-9043.

⁴¹ Gurevich, A.Z.; Barsukov, I.L.; Arseniev, A.S.; Bystrov, V.F., *J. Magn. Reson.*, **1984**, 56, 471-478.

⁴² (a) Kupče, E.; Freeman, R.; John, B.K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 9606-9607; (b) Kupče, E.; Cheatham, S.; Freeman, R. *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, 45, 378-380.

Esta técnica puede servir de complemento a otras estrategias de adquisición rápida de RMN como la Proyección-Reconstrucción, Hadamard o *Aliasing*.⁴³ La disposición de múltiples receptores, si bien encarece el coste del espectrómetro, es claramente una opción de futuro.

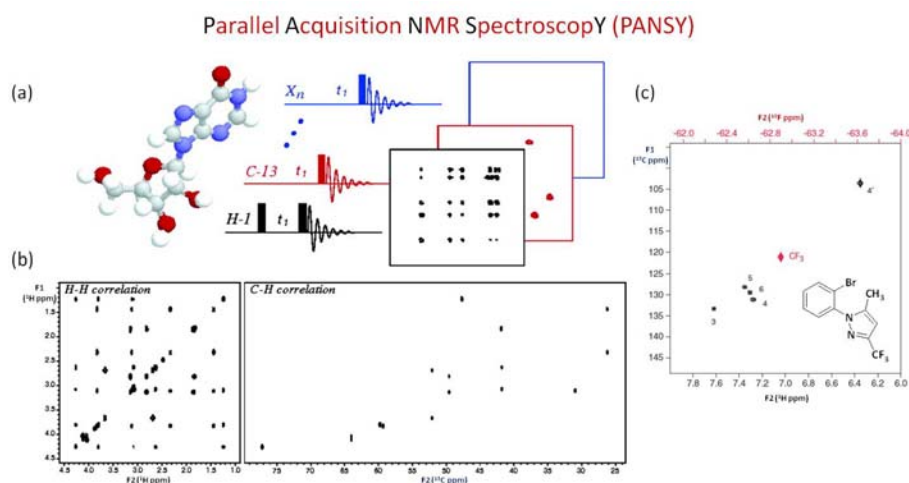


Figura II.12. (a) Esquema del principio de la técnica PANSY y diferentes espectros registrados en paralelos a 600 MHz, (b) ^1H , ^1H -TOCSY y ^1H , ^{13}C -HSQC obtenidos en 20 min para una muestra de brucina, y (c) ^{19}F , ^{13}C y ^1H , ^{13}C -HSQC para una muestra de 2-bromofenol-3-trifluorometil-5-metilpirazol, obtenidos en 22 min.

II.2.3.2 Adquisición múltiple mediante evolución compartida (MATS)

La secuencia de pulsos MATS (*Multiple-FID Acquisition Time-Shared evolution*), desarrollada por el grupo del Dr. Teodor Parella (UAB) combina los principios del tiempo de evolución compartido de coherencias independientes⁴⁴ y la adquisición de múltiples FIDs dentro de un mismo barrido. Con ello se obtienen en un único experimento hasta 4 espectros HMBC de ^{13}C y de ^{15}N en condiciones de abundancia natural.⁴⁵

Ello se consigue compartiendo la etapa de evolución y empleando gradientes que seleccionan (G1-G4 para el primer HMBC, Figura II.13) y reenfozan (G5 para

⁴³ Kupče, E.; Freeman, R. J. *Magn. Reson.* **2011**, 213, 1-13.

⁴⁴ (a) Nolis, P.; Pérez-Trujillo, M; Parella, T., *Org. Lett.* **2007**, 9, 29-32. (b) Nolis, P.; Pérez-Trujillo, M; Parella, T., *Magn. Reson. Chem.* **2006**, 44, 1031-1036.

⁴⁵ Nolis, P.; Pérez-Trujillo, M; Parella, T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7495-7497.

el segundo HMBC, Figura II.13) las magnetizaciones adecuadas dentro de cada uno de los experimentos adquiridos. Los diferentes periodos de adquisición se introducen dentro de la secuencia de pulsos de manera directa, sin necesidad de ninguna alteración, pulso o *delay* adicional. La ganancia del tiempo de adquisición con este método es del 75% aproximadamente.

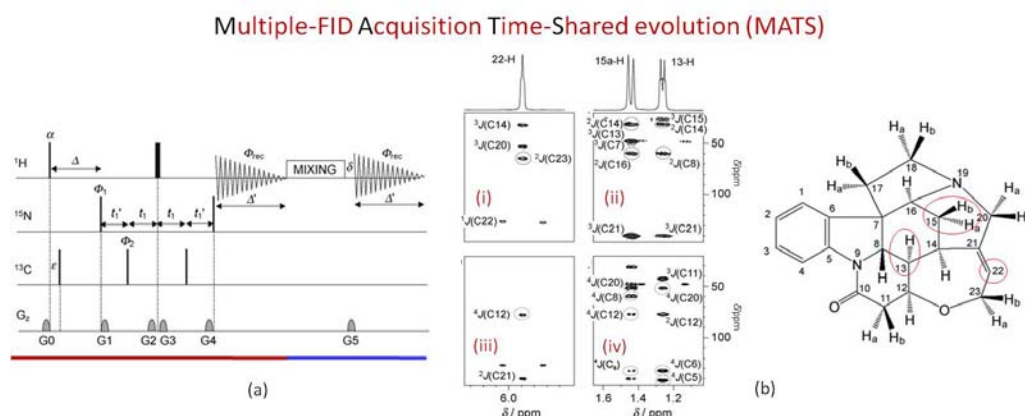


Figura II.13. (a) Esquema de la secuencia de pulsos MATS, (b) áreas expandidas de i), ii) espectros HMBC de la estricnina, que proporcionan la información a dos y tres enlaces; iii), iv) espectros del segundo HMBC-COSY, que muestran las correlaciones restantes.

II.2.3.3 Espectroscopía paralela localizada (PALS^Y)⁴⁶

La secuencia PALS^Y (*PA*rallel *L*ocalized *a*cquisition *S*pectroscopy), desarrollada por el grupo del Prof. Manuel Martín-Pastor (USC), consiste en la realización de diferentes experimentos espacialmente localizados de RMN nD en paralelo. Es decir, el volumen total de la muestra estudiada se divide en un número discreto de cortes, mediante la combinación de pulsos de radiofrecuencia selectivos y gradientes de campo magnético (este fenómeno se conoce como selección espacial). Estas secciones no se superponen entre ellas y en cada una, de manera individual, se lleva a cabo un experimento de RMN diferente.

Esta secuencia también busca reducir el tiempo de espera entre los diferentes barridos, ya que el tiempo que se requiere en un corte para que tenga lugar la relajación de sus espines, es empleado en otra sección diferente para registrar

⁴⁶ Vega-Vázquez, M.; Cobas, J. C.; Martín-Pastor, M. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 749-752.

un nuevo espectro. Con ello se logra que el tiempo total del experimento sea reducido de manera importante.

Asimismo, con esta estrategia se consiguen registrar hasta 3 espectros simultáneos que se obtienen en un tiempo 3 - 4 veces inferior al de la resonancia estándar. La resolución no se ve comprometida en ninguna de las dos dimensiones y la obtención de los espectros se lleva a cabo aplicando la transformada de Fourier tradicional.

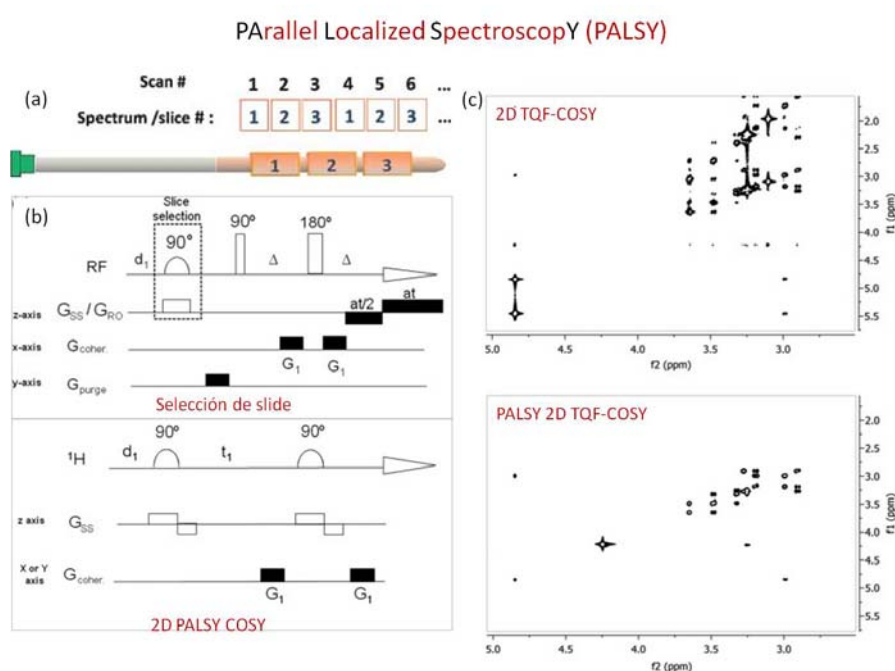


Figura II.14. (a) La Espectroscopía paralela localizada (PALSy) se basa en dividir la muestra en cortes (1, 2, 3) mediante el empleo de gradientes y pulsos selectivos. (b) Secuencia de pulsos PALSy: dependiendo de las proporciones de G_1 y G_2 se obtiene el espectro DQF-COSY o el TQF-COSY. (c) De cada uno de estos cortes se registra un experimento diferente; aquí se comparan el espectro 2D TQF COSY tradicional (arriba) y el espectro PALSy 2D TQF COSY, adquirido en 1 min.

II.3 Espectroscopía de RMN Ultrarrápida (UF-NMR)

Además de las técnicas mencionadas anteriormente, se ha descrito una innovadora metodología denominada espectroscopía de RMN ultrarrápida (UF-NMR), que permite la adquisición de experimentos RMN nD en un único barrido. Por ello también se le ha denominado *single scan NMR*.^{47,48} Con esta técnica se ha logrado acortar drásticamente los tiempos de adquisición en varios órdenes de magnitud. Así, por ejemplo, un experimento de correlación homonuclear UF-TOCSY puede ser adquirido en 0.16 s,⁴⁹ tal y como se observa en la Figura II.15. Además, no se requiere información a priori del sistema estudiado, es compatible con cualquier secuencia de pulsos y puede ser implementada usando un hardware convencional. Los principios de esta metodología han sido extensamente descritos recientemente en la literatura.^{50,51,52}

La UF-NMR propuesta por Lucio Frydman y colaboradores en el año 2002, mantiene el esquema general de Jeener-Ernst para la RMN nD tradicional: *Preparación - Evolución (t_1) - Mezcla - Detección (t_2)*. La diferencia fundamental se deriva de la aplicación de las técnicas de excitación y adquisición desarrolladas por Mansfield⁵³ para la imagen de resonancia magnética nuclear (IRM).

En la RMN ultrarrápida, se reemplaza el esquema tradicional de N_1 incrementos secuenciales con diferentes valores de t_1 (Figura II.6), por el muestreo simultáneo de dicha dimensión mediante una *codificación espacial*.

Esto se consigue a partir de la implementación conjunta de gradientes de campo magnético a lo largo de una dirección y pulsos de RF variable, los cuales, tal como se muestra en la Figura II.16, dividen el volumen total de la muestra en un número de N_1 cortes. Cada uno de ellos evoluciona con un tiempo t_1 diferente,

⁴⁷ Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 9204-9217.

⁴⁸ Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2002**, *99*, 15858-15862.

⁴⁹ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

⁵⁰ Brutscher, B.; Marion, D.; Frydman, L. Speeding Up Multidimensional NMR Data Acquisition. En *NMR of Biomolecules: Towards Mechanistic Systems Biology*; Bertini, I.; McGreevy, K.S.; Parigi, G., Eds., Wiley: Somerset, NJ, USA, 2012, pp 445-465.

⁵¹ Tal, A.; Frydman, L. *Prog. Nuc. Magn. Res. Spect.*, **2010**, *57*, 241-292.

⁵² (a) Mishkovsky, M.; Frydman, L. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2009**, *60*, 429-448. (b) Gal, M.; Frydman, L. "Ultrafast multidimensional NMR: Principles and practice of single-scan methods", En *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, Harris, R.K.; Wasylishen, R., Eds., John Wiley: New York, 2009.

⁵³ Mansfield, P. *Magn. Reson. Med.*, **1984**, *1*, 370-386.

es decir, con una frecuencia de resonancia propia. De esta manera, se ha generado la segunda dimensión del experimento en un único barrido.

Tiempos de adquisición en la UF-NMR

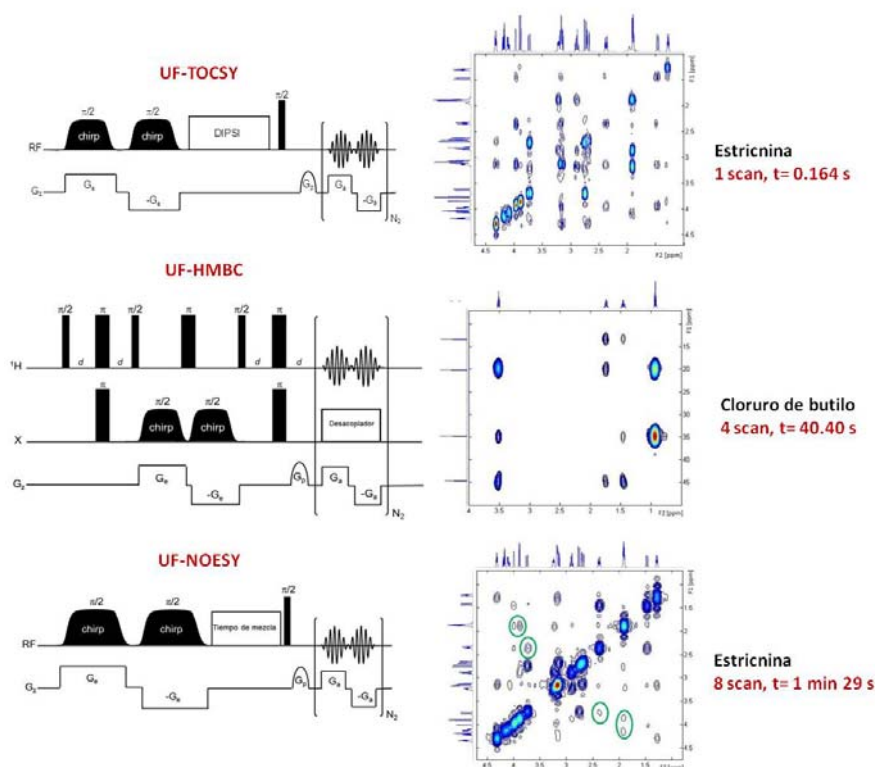


Figura II.15. En la UF-NMR es posible adquirir experimentos de RMN 2D de correlación escalar homo y heteronucleares, así como experimentos de correlación dipolar. Todos ellos requieren tiempos de adquisición muy inferiores a los logrados en los experimentos de RMN 2D tradicionales, aún en los casos en los que es necesario más de un barrido.

Posteriormente, al final de la secuencia de pulsos y durante la adquisición de los datos, es necesario deshacer la codificación espacial de los espines conservando las frecuencias asociadas a su evolución interna. Para ello, se utilizan gradientes oscilantes de campo magnético capaces de registrar las magnetizaciones en función de la posición.

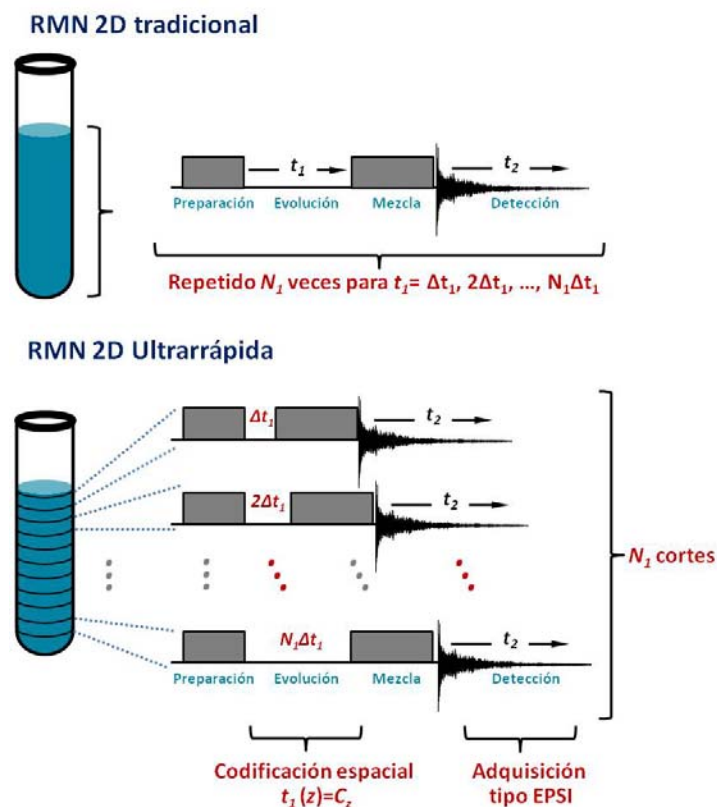


Figura II.16. Esquema de la RMN 2D tradicional (arriba) y la RMN 2D ultrarrápida (abajo). En el primer caso cada experimento 1D se repite N_1 veces con diferentes valores del tiempo de evolución t_1 . En el segundo caso los N_1 pasos de la codificación del tiempo t_1 , se ejecutan en paralelo mediante una excitación espacialmente selectiva, que a su vez es generada por la aplicación conjunta de pulsos de RF y gradientes de campo magnético. La decodificación espacial tiene lugar durante la adquisición haciendo uso de una secuencia EPSI, que a la vez codifica el tiempo de evolución t_2 .

Aplicando la RMN ultrarrápida es posible el estudio de procesos dinámicos como la transformación de reactivos a productos en reacciones orgánicas rápidas, la detección de sustancias mediante experimentos de RMN 2D en la elución de una columna cromatográfica, el seguimiento del doblado de las proteínas, o el intercambio de sus protones lábiles por deuterio. También es posible la implementación de experimentos de RMN de alta dimensionalidad, por ejemplo la RMN 4D, en una duración compatible con los tiempos de vida de la mayoría de las proteínas bajo condiciones fisiológicas, o incluso facilitar la incorporación de secuencias espectroscópicas 2D dentro de la imagen de RMN *in vivo*.

En los siguientes apartados se discutirán los principios y características generales de esta novedosa técnica y se describirán además algunas de sus aplicaciones más relevantes.

II.3.1 Principios y características generales de la UF-NMR

La realización de la UF-NMR implica cambios significativos en los periodos de evolución (t_1) y detección (t_2) de la secuencia tradicional de RMN. Así, en la primera etapa se ha de introducir una dependencia espacial para la evolución de los espines de la muestra denominada codificación espacial y en la etapa final de detección habrá de resolverse dicha codificación. Estas modificaciones provienen de la IRM, en la que la información obtenida posee una dependencia espacial. Parea ello se hace necesario el empleo de gradientes de campo magnético y pulsos de RF selectivos o adiabáticos. Seguidamente se comentan aspectos generales acerca de la naturaleza y efectos de estos elementos.

II.3.1.1 Gradientes de campo y pulsos de radiofrecuencia (RF)

Los **gradientes de campo magnético**, G , consisten en la variación controlada de la intensidad del campo magnético principal B_0 , haciéndolo espacialmente no homogéneo en una coordenada específica, durante un periodo de tiempo τ , que suele ser del orden de los milisegundos.

Los gradientes son generados mediante un flujo de corriente a lo largo de una bobina independiente a la que origina el campo magnético principal. Si el flujo de esta corriente cambia de dirección, se dice que el gradiente cambia de signo. Su fuerza se expresa en unidades de campo magnético por unidades de longitud, por ejemplo Gauss por centímetro (Gcm^{-1}) o Tesla por metro (Tm^{-1}).

El propósito de un gradiente de campo es conseguir que la frecuencia de precesión o de Larmor (ω_0) de cada núcleo dependa de la posición que ocupa en la muestra. Así, a lo largo de la dirección del gradiente, por ejemplo el eje \hat{z} , la muestra será sometida a un campo magnético de intensidad diferente en cada punto B_z .⁵⁴ Con ello se genera una distribución espacial de frecuencias.

⁵⁴ Formalmente un gradiente de campo magnético, G_z , es un campo adicional que se suma al principal, B_0 . Por tanto, el campo magnético resultante B_z es la suma de ambos según la siguiente relación: $B_z = B_0 + G_z$.

Acción de un gradiente de campo magnético $G(z)$
sobre las frecuencias de precesión

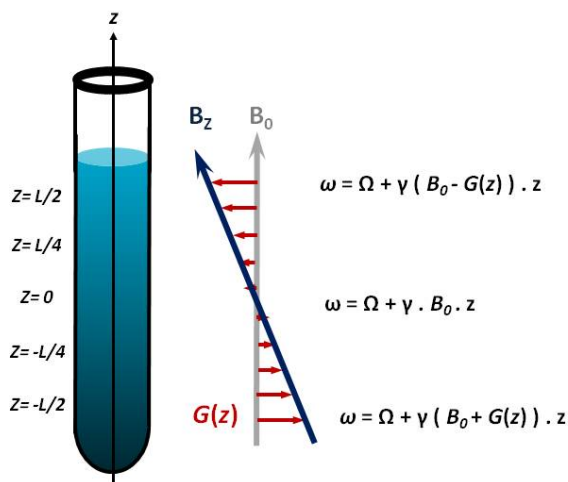


Figura II.17. Efecto de un gradiente de campo sobre una muestra. Al aplicar un gradiente $G(\hat{z})$, el campo magnético principal B_0 se hace inhomogéneo, pues quien actúa realmente es B_z . Ello conduce a que la frecuencia de Larmor (ω) de los espines se haga dependiente de la posición (\hat{z}) dentro del tubo. En la figura L es la longitud de la muestra.

Por otra parte, tal y como se ha comentado anteriormente, **los pulsos de radiofrecuencia (RF)** son emisiones temporales de ondas de radio. Cuando poseen los valores adecuados de potencia, duración (longitud del pulso, t_p) y frecuencia de oscilación,⁵⁵ ω_{rf} , se produce la resonancia con la frecuencia de Larmor, ω_0 , de la magnetización resultante de la muestra estudiada. Es decir que estos pulsos logran que la magnetización se desplace al plano transversal, ($\hat{x}\hat{y}$), donde puede ser detectada.

En la RMN de manera generalizada se emplean pulsos de RF *duros* o *no-selectivos*, los cuales poseen una frecuencia ω_{rf} determinada, una fase fija, además de potencias elevadas y corta duración. Estos pulsos suelen ser adecuados para excitar un rango amplio de frecuencias de resonancia a la vez.

⁵⁵ La frecuencia del pulso ν_{rf} es la frecuencia de oscilación de la RF, también conocida como frecuencia del transmisor o portadora. Su frecuencia angular se denomina ω_{rf} . Generalmente coincide con el centro de la ventana espectral que se quiere estudiar y con la señal de referencia utilizada en la detección por el receptor.

En los espectrómetros modernos, es posible modular la amplitud y la frecuencia (o la fase) de los pulsos de RF. Por tanto, es posible diseñar pulsos *blandos* o *selectivos*, los cuales son de larga duración y poseen bajas potencias, lo que hace que sean efectivos en un intervalo muy limitado de frecuencias. Así, sólo se excitarán los espines correspondientes a una señal en el espectro con una determinada frecuencia de Larmor, o bien, una región específica de la ventana espectral.

Estos pulsos de RF, duros o blandos, poseen una frecuencia del pulso constante, ω_{rf} , y su tiempo de aplicación o longitud, t_p , es inversamente proporcional al rango de frecuencias excitadas. Sin embargo, también existen pulsos de RF *adiabáticos* los cuales poseen una frecuencia, que varía con el tiempo a lo largo del pulso, $\omega_{rf}(t)$.⁵⁶

Existen diferentes tipos de pulsos de RF adiabáticos y entre ellos se encuentran los pulsos *chirp*,^{57,58} los cuales tienen un uso bastante extendido dentro de la RMN de alta resolución. El objetivo de este pulso es barrer un rango de frecuencias a una velocidad adecuada durante su tiempo de aplicación. De esta forma, a un cierto tiempo t' , el pulso *chirp* solo afectará a aquellos espines con una frecuencia de resonancia o de Larmor igual a $\omega_{ch}(t')$ y por tanto, solamente será la magnetización de este grupo de espines la que se desplace al plano transversal ($\hat{x}\hat{y}$). Allí continuará precesionando libremente, hasta el final del pulso de RF.

Así, un pulso *chirp* que posee un barrido de frecuencias lineal, afectará a todas las frecuencias desde O_i hasta O_f . Estos pulsos se definen por la amplitud de dicho barrido de frecuencias, que suelen ser decenas de KHz, por la longitud del pulso, que oscila en el orden de los milisegundos y por su amplitud máxima.

Si los gradientes de campo magnético y los pulsos de RF son aplicados de manera secuencial o de forma simultánea, se obtendrán diferentes efectos en la evolución de las magnetizaciones de la muestra. En la Figura II.18 se puede observar el efecto de la aplicación secuencial de un pulso excitación de 90° y un

⁵⁶ Garwood, M.; DelaBarre, L. *J. Magn. Reson.*, **2001**, 153, 155-177.

⁵⁷ Bohlen, J.M.; Bodenhausen, G. *J. Magn. Reson. (A)*, **1993**, 102, 293-301.

⁵⁸ Dentro del contexto de las ondas electromagnéticas, el término chirp se refiere a la variación temporal de la frecuencia que se puede introducir en un pulso, similar a la variación del tono (de grave a agudo o viceversa) que se produce en el canto de los pájaros.

gradiente $G(\hat{z})$. Como consecuencia, las magnetizaciones se reordenan a lo largo de la muestra, formando una espiral.

Esto es debido a que tras el pulso duro de excitación, los espines, inicialmente en equilibrio térmico a lo largo del eje \hat{z} , son desplazados al plano $\hat{x}\hat{y}$. Posteriormente, la presencia del gradiente de campo hará que los espines de cada punto en la muestra evolucionen con una frecuencia de Larmor característica. Es decir, la hélice es producto de la evolución de los espines durante un intervalo de tiempo τ , con una frecuencia diferente dependiendo de la coordenada \hat{z} . Se ha producido un desfase de la señal total.

Acción secuencial de un pulso $\pi/2$ y un gradiente de campo magnético $G(z)$

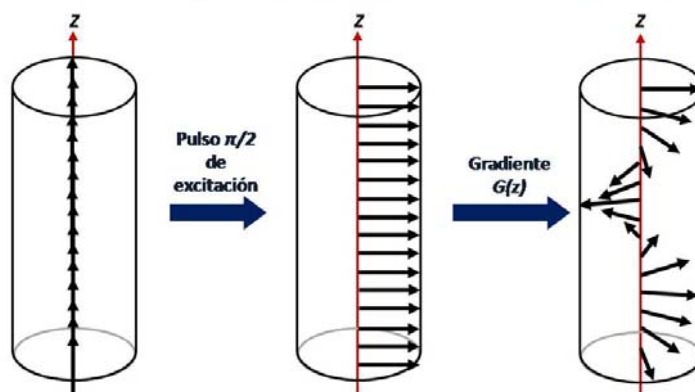


Figura II.18. Efecto de un gradiente de campo magnético sobre una muestra. Los espines inicialmente en equilibrio y alineados con el campo externo, son excitados por un pulso de 90° y posteriormente es aplicado un gradiente $G(\hat{z})$. Las magnetizaciones se ubicarán en el plano $\hat{x}\hat{y}$ abandonando su estado de equilibrio. En esta figura no se ha tenido en cuenta el efecto del desplazamiento químico.

Cuando los gradientes de campo magnético se aplican de manera simultánea tanto con pulsos de RF selectivos, como con pulsos *chirp*, se consigue el efecto de *codificación espacial* necesario para la adquisición de los experimentos de UF-NMR, tal y como veremos en el siguiente apartado.

II.3.1.2 Excitación: Codificación espacial

El esquema de la RMN ultrarrápida se fundamenta en la generación de una codificación espacial de los espines de la muestra y en el registro simultáneo de su evolución para diferentes valores de t_1 , logrando de esta manera explorar la dimensión indirecta, todo ello en un único barrido.

En la literatura se han descrito varios modelos de codificación con los que es posible conceder una dependencia espacial a la evolución en t_1 .^{59,60} La primera propuesta descrita se basa en el esquema de codificación discreta, el cual aplica un tren de N_1 pulsos selectivos como se muestra en la Figura II.19 (a) y el esquema de codificación espacial continua, el cual se basa en pulsos de RF adiabáticos *chirp*. Esta puede ser modulada en amplitud o de tiempo constante, dependiendo del ángulo de rotación de los pulsos *chirp* empleados, tal y como se observa en la Figura II.19 (b) y (c) respectivamente.

Diferentes esquemas de codificación espacial

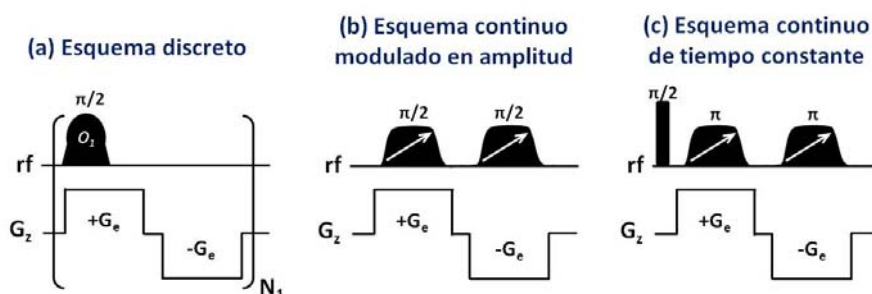


Figura II.19. Diferentes esquemas para la creación de un tiempo de evolución t_1 en cada corte en los que se ha de dividir la muestra. (a) codificación discreta, (b) codificación continua modulada en amplitud y (c) codificación continua de tiempo constante. Las flechas en los pulsos *chirp* indican la dirección del barrido de frecuencias.

Aunque las secuencias de pulsos de los experimentos de UF-NMR aplicados en el desarrollo de esta Tesis se basan en el esquema de codificación espacial continuo, en esta memoria se empieza explicando la codificación espacial mediante el esquema discreto, ya que la visualización del procedimiento de excitación resulta más clara para esta estrategia.

La codificación espacial produce, la división física de la muestra en diferentes secciones o cortes. Para ello se requiere la aplicación de gradientes de campo magnético, que como se ha comentado anteriormente, generan diferentes frecuencias para las magnetizaciones nucleares dentro la muestra. Cada una

⁵⁹ (a) Tal, A.; Shapira, B.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2005**, 176, 107-114. (b) Andersen, N.S.; Kockenberger, W. *Magn. Reson. Chem.*, **2005**, 43, 795-797. (c) Shapira, B.; Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2006**, 178, 33-41.

⁶⁰ (a) Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.*, **2006**, 125, 204507. (b) Shrot, Y.; Tal, A.; Frydman, L. *Magn. Reson. Chem.*, **2009**, 47, 415-422. (c) Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.*, **2009**, 131, 224516.

precesionará con una frecuencias de resonancia propia, $\omega_0(\hat{z})$. Por ello, a este fenómeno también se le conoce como distribución espacial de frecuencias. (Figura II.20).

Simultáneamente, y según el esquema de codificación discreto, se aplica un tren de N_1 pulsos selectivos con el fin de crear una dependencia espacial del tiempo de evolución t_1 , lo cual dará origen a la segunda dimensión.

Este efecto se muestra en la Figura II.20. Cuando la frecuencia de dichos pulsos coincida con la frecuencia de resonancia de un conjunto de núcleos en una región de la muestra, estos absorberán energía, es decir son excitados, dando comienzo a su evolución.

El final de dicha evolución tiene lugar al mismo tiempo para todos los núcleos, por lo que el t_1 de cada corte dependerá de su posición en la muestra. El tren de pulsos se aplica a intervalos equiespaciados y en cada paso se incrementa regularmente su frecuencia portadora, ω_{rf} . Esta condición introduce una dependencia entre el tiempo de evolución t_1 de cada grupo de espines pertenecientes a una sección determinada de la muestra y la posición de dicha sección dentro de la muestra. Este fenómeno se conoce como **excitación espacial selectiva** y el número de incrementos en t_1 será igual al número de pulsos selectivos que componen el tren de pulsos empleado.

A continuación, se aplica un gradiente de campo de signo opuesto, pero con la misma amplitud e intervalo de tiempo. Con ello se busca compensar la acción realizada por el primer gradiente, de modo que la señal obtenida tras la excitación espacial sólo refleje la evolución interna (las frecuencias debidas al desplazamiento químico) de cada uno de los cortes dentro de la muestra, Ω_1 , y no las frecuencias definidas por el gradiente. Dicho de otra manera, la secuencia de gradientes bipolares aplicada, generará un eco de gradiente en el que cualquier desfase debido al gradiente de excitación $+G_e$, estará compensado por el gradiente inverso $-G_e$.

Etapa de preparación y evolución de la UF-NMR: Codificación espacial discreta

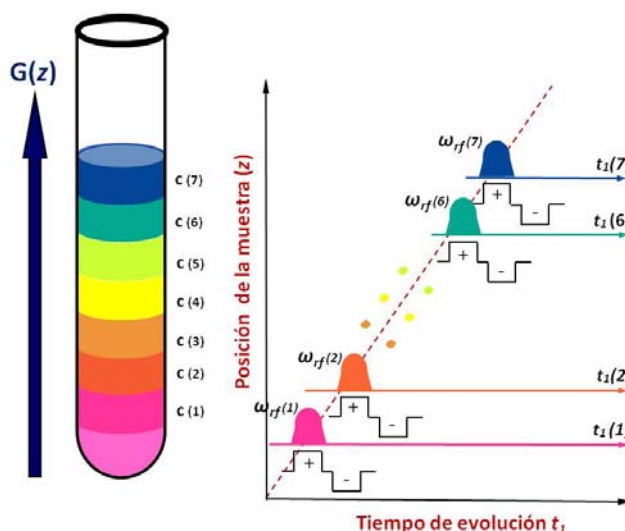


Figura II.20. Codificación espacial discreta para la UF-NMR. Se muestra un experimento hipotético con siete incrementos en el valor de t_1 . Se aplica de manera secuencial un tren de siete pulsos de excitación selectivos. Cada frecuencia $\omega_{rf}^{(1)} - \omega_{rf}^{(7)}$ corresponde a un corte dentro de la muestra, en presencia de un gradiente de campo magnético, G_e . Con ello se logra una excitación espacial selectiva. Con el fin de reenfoque la evolución en el desplazamiento químico causada por el gradiente, $+G_e$, se aplica un segundo gradiente de signo opuesto, $-G_e$. De esta manera la señal obtenida refleja exclusivamente la evolución interna de los espines de cada uno de los cortes dentro de la muestra.

Al final de la codificación espacial se habrá generado una espiral de magnetizaciones, que a diferencia del caso mostrado en la Figura II.18, no se forma debido al efecto de un gradiente de campo magnético, sino que estará creada por los desplazamientos químicos de los espines.

La etapa de codificación espacial requiere un tiempo del orden de milisegundos, mientras que la etapa equivalente en el esquema de la RMN tradicional, en la cual se genera la dimensión indirecta, requiere entre decenas y cientos de segundos.

El esquema de excitación discreto tiene algunos inconvenientes prácticos. Entre ellos se encuentra la necesidad de utilización de numerosos gradientes de campo, que se encienden y apagan y que a su vez deben estar cuidadosamente sincronizados con los pulsos de RF. Asimismo, este esquema de excitación da

lugar a la aparición de señales “fantasma” en el dominio indirecto.^{61,62} Estos artefactos coinciden algunas veces con las señales genuinas, con lo que pueden dificultar la interpretación del espectro.

Por otro lado, el esquema de excitación continuo^{63,64} hace frente a las limitaciones del esquema discreto. Este enfoque busca que $\Delta\hat{z}$ (cambio en la posición) y Δt_1 (cambio en los diferentes valores del tiempo de evolución a lo largo de la muestra) se hagan infinitesimalmente pequeños, lo que, en esencia, dará lugar a la codificación espacial continua de Ω_1 .

Para ello, se reemplaza el tren de pulsos de RF selectivos por un par de pulsos de RF *chirp* idénticos con el fin de generar la dependencia espacial del tiempo de evolución, t_1 . Ambos pulsos *chirp* son aplicados de manera simultánea con cada uno de los gradientes de excitación ($+G_e$ y $-G_e$); el primero de ellos tiene el fin de excitar y el segundo de almacenar (Figura II.19 4b) y (c)).

En los pulsos *chirp*, la frecuencia $\omega_{ch}(t)$, varía linealmente con el tiempo y en presencia de un gradiente de campo magnético, excitará los espines de forma lineal, desde una posición $-L/2$ hasta la posición $+L/2$, siendo L la longitud de la muestra (Figura II.21).

En el instante t_z , el pulso *chirp* de excitación afectará sólo aquellos espines con una frecuencia de resonancia igual a $\omega_{ch}(+t_z)$ y los desplazará al plano $\hat{x}\hat{y}$. Durante el resto del pulso ($T_e - t_z$) continuarán precesionando libremente hasta el final del mismo, evolucionando con un t_1 propio.

De igual manera, el pulso *chirp* de almacenamiento solo afectará aquellos espines que se encuentran en el plano $\hat{x}\hat{y}$, a consecuencia del primer pulso *chirp* de excitación y que tengan una frecuencia de resonancia igual a $\omega_{ch}(-t_z)$. Su objetivo es devolverlos al eje longitudinal \hat{z} ; sin embargo, este pulso *chirp* sólo desplazará la componente del vector magnetización que es perpendicular a sí mismo (M_{\perp}). La otra componente que es paralela a él (M_{\parallel}) no será almacenada y por tanto permanecerá en el plano $\hat{x}\hat{y}$ hasta que se disperse por completo. Esto mismo

⁶¹ Las señales “fantasma” son ecos adicionales del dominio indirecto, que flanquean los ecos principales, pertenecientes a las verdaderas señales de correlación en el espectro de UF-NMR.

⁶² Shrot, Y.; Frydman, L. J. *Magn. Reson.*, **2003**, 164, 351-357.

⁶³ Shrot, Y.; Shapira, B.; Frydman, L. J. *Magn. Reson.*, **2004**, 171, 163-170.

⁶⁴ Pelupessy, P. J. *Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 12345-12350.

ocurre para cada una de las posiciones en el volumen total de la muestra. La Figura II.21 ilustra este proceso.

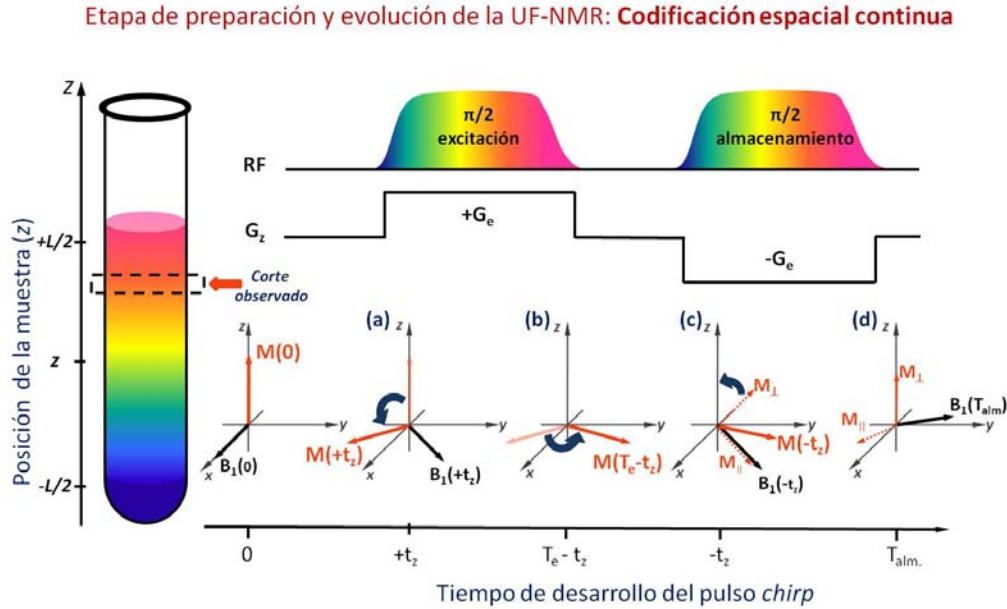


Figura II.21. En el esquema de codificación continuo, con el fin de generar la dependencia espacial del tiempo de evolución, t_1 , se implementan pulsos *chirp* en conjunto con un par de gradientes de codificación bipolares ($+G_e$, $-G_e$). Estos consiguen que $\Delta\hat{z}$ y Δt_1 sea infinitesimalmente pequeño dando como resultado una codificación espacial continua. (a) El primer pulso es de excitación, de modo que en el instante $+t_z$, el pulso (B_1) afectará sólo aquellos espines con una frecuencia de resonancia igual a $\omega_{ch}(+t_z)$ y los desplazará al plano $\hat{x}\hat{y}$. (b) Durante el resto del pulso ($T_e - t_z$) la magnetización (M) continuarán precesando libremente hasta el final del mismo. (c) El segundo pulso es de almacenamiento, de modo que el instante $-t_z$ el pulso afectará sólo aquellos espines con una frecuencia de resonancia igual a $\omega_{ch}(-t_z)$, sin embargo, su objetivo es poner de vuelta al eje \hat{z} la componente de la magnetización que es perpendicular al pulso (M_\perp). La componente paralela (M_\parallel) seguirá precesando en el plano $\hat{x}\hat{y}$ hasta que finalmente se dispersa. Este mismo proceso ocurre para cada uno de las posiciones de la muestra, obteniendo por tanto un valor diferente de t_1 para cada una de ellas. El signo positivo o negativo del t_z hace referencia a que ocurre mientras está activo el gradiente $+G_e$ o $-G_e$ respectivamente.

Este esquema alternativo ofrece ciertas ventajas prácticas sobre la excitación espacial discreta, como por ejemplo la necesidad de un único par de gradientes bipolares ($+G_e$ y $-G_e$) menos intensos, en lugar de los numerosos gradientes que se encienden y apagan, requeridos para cada uno de los N_1 pulsos selectivos en el esquema discreto. Esto se traduce en menores demandas del hardware de

los espectrómetros y como consecuencia se obtiene una reducción de los artefactos instrumentales y la mejora en la forma de la línea en la dimensión indirecta. Asimismo, con este esquema es posible eliminar algunos artefactos espectrales asociados al esquema discreto.

En resumen, la combinación de gradientes de campo magnético de codificación, G_e , y secuencias de pulsos de RF, bien sean de carácter selectivo o adiabático (*chirp*), producen en la muestra diferentes cortes en los que los núcleos pertenecientes a dichas secciones evolucionarán con una frecuencia distinta. Logrando así, una excitación inicial heterogénea.

El paso siguiente a la codificación espacial dentro del esquema general para la adquisición de un experimento de UF-NMR es la *etapa de mezcla*, tal y como se ilustra en la Figura II.22.

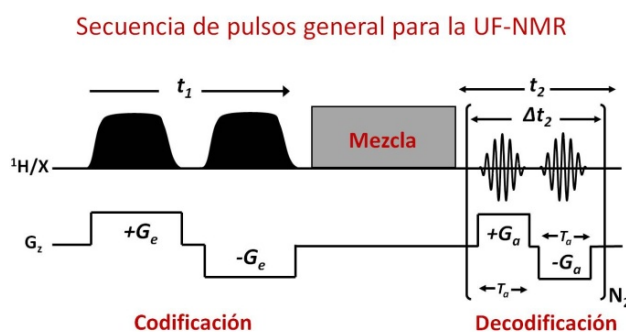


Figura II.22. Esquema general para la UF-NMR.

Al final del tiempo de evolución, la magnetización total de un núcleo que resuena a una frecuencia Ω_1 y que se encuentra situado en la posición \hat{z} , obtendrá una fase tal que permite que sea visualizada como una espiral cuyo bucle depende de su valor de Ω_1 (Figura II.24). La torsión de esta espiral puede ser representada por: $\phi(z) = C\Omega_1(z - z_0)$ en donde C depende del tipo de codificación espacial realizada y z_0 es un parámetro bajo el control experimental; por tanto, el patrón de bobinado dependerá del valor de $C\Omega_1$.

El periodo de mezcla es común tanto para el esquema de RMN tradicional como para la UF-NMR. Los elementos que la componen pueden variar desde un simple pulso de 90° hasta un esquema más complejo, determinando así la información que contendrá el espectro final. Durante esta etapa la fase adquirida por las

magnetizaciones, las cuales representan la evolución interna de los espines, se conserva y será por tanto el punto de partida de la etapa de adquisición.

II.3.1.3 Detección: Decodificación espacial

En la RMN tradicional para obtener espectros 2D, las señales se recogen en función de dos variables t_1 y t_2 , que mediante una doble transformada de Fourier se disponen en función de las frecuencias Ω_1 y Ω_2 . Sin embargo, en el caso de la UF-NMR 2D, la estrategia para obtener la información en función de estas dos frecuencias Ω_1 y Ω_2 es diferente.

En primer lugar se aplica un gradiente de campo magnético que permite conocer la distribución de los espines según su posición, formado así ecos proporcionales a Ω_1 , que dan paso a la construcción de la dimensión indirecta (F_1). A continuación se alternan estos gradientes, permitiendo que tenga lugar la evolución del desplazamiento químico y la modulación de la señal en función de la variable t_2 , con el fin de muestrear la información con respecto a Ω_2 y formar la dimensión directa,⁶⁵ tal como se describirá más adelante.

Como consecuencia del periodo de evolución, cada núcleo no equivalente habrá obtenido una fase dependiente de la posición, es decir, cada uno de ellos presentará su propia hélice, en donde se cumple que cuanto mayor sea el desplazamiento químico del núcleo, Ω_1 , más estrecho será el bobinado de su espiral.

Adquirir una señal en ese momento requiere la suma vectorial de las contribuciones de todos los núcleos en la muestra; sin embargo debido a que las hélices no coinciden entre ellas, se interferirán destructivamente anulando la señal total. Por tanto, no existirá una señal observable y se obtendrá solamente ruido como resultado.

En la espectroscopía de UF-NMR, se busca idealmente poder diferenciar cada uno de los volúmenes en los que se ha sido dividida la muestra y obtener un espectro de cada uno de ellos. Estos espectros en función de la posición, requieren que las señales sean decodificadas espacialmente. Mansfield ha propuesto una manera de enfrentar este desafío en un único barrido mediante la

⁶⁵ Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.*, **2008**, 128, 052209.

secuencia EPSI (*Echo Planar Spectroscopy Imaging*),⁶⁶ en la cual la señal es adquirida en presencia de gradientes de campo magnético oscilantes, que tienen la forma mostrada en la Figura II.23.

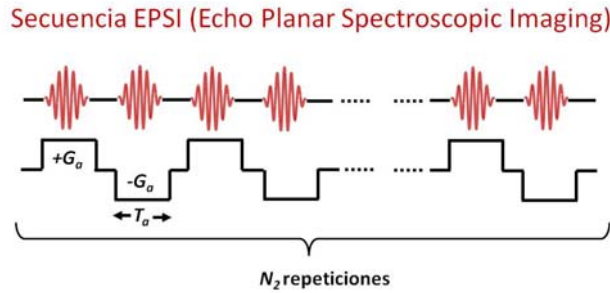


Figura II.23. Esta secuencia permite obtener espectros en función de la posición en un único barrido; en ella, los datos son adquiridos en presencia de gradientes de adquisición oscilantes.

El periodo de detección total de la UF-NMR, como se observa en la Figura II.22, tiene un tiempo de duración t_2 y está compuesto por N_2 segmentos de extensión Δt_2 . Cada segmento incluye dos gradientes, G_a , de signo opuesto y duración T_a .

Aplicando el primer gradiente de adquisición, se logra que las señales de todos los grupos de espines adquieran una fase común adicional, representada por $\phi_a(t) = (C\Omega_1 + k)z$ en donde $k = \gamma_a G_a t$, que compensa la fase introducida durante el tiempo de evolución. En otras palabras, deshace cada una de las espirales de modo que, cuando los espines en cada sección de volumen de la muestra, con un Ω_1 característico, son alineados, cesan las interferencias destructivas y se obtiene una señal observable. Dicho de otra manera, se forma un eco. Esto se produce cuando $k = -C\Omega_1$.

Después de la formación del eco la magnetización de los espines se dispersa, es decir, se envuelve formando nuevamente la hélice. Así, la señal disminuirá hasta el nivel del ruido.

Esto implica que una muestra que contiene n desplazamientos químicos, $\Omega_1^{(1)}$, $\Omega_1^{(2)}$, ..., $\Omega_1^{(n)}$ antes del tiempo de mezcla, producirá n ecos en diferentes momentos dentro del periodo de detección. La Figura II.24 ilustra este proceso,

⁶⁶ Mansfield, P. *Magn. Reson. Med.*, **1984**, *1*, 370-386.

en la que por simplicidad, sólo se han representado dos desplazamientos químicos diferentes.

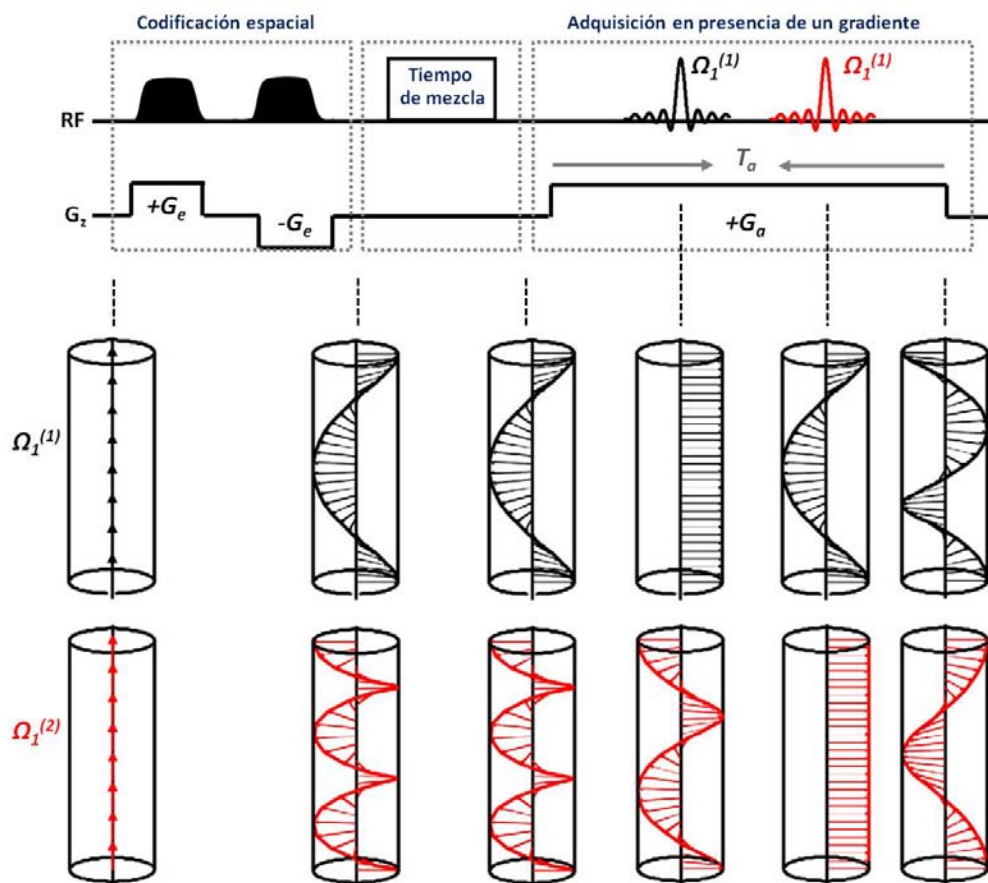


Figura II.24. Adquisición de un experimento de UF-NMR para una muestra con dos desplazamientos químicos diferentes, $\Omega_1^{(1)}$, $\Omega_1^{(2)}$, el cual se lleva a cabo en presencia de un gradiente de campo. Durante la codificación espacial los espines son desplazados al plano $\hat{x}\hat{y}$ y se forma hélices a lo largo del eje \hat{z} . El bobinado de estas espirales es proporcional a sus respectivos desplazamientos químicos. Una vez codificada, se aplica la etapa de mezcla, durante la cual se conserva la torsión. En ese momento se aplica un gradiente de campo a la vez que se adquiere la señal. Estos gradientes reenfozan las hélices; así, cuando los espines se alinean entre ellos dan lugar a la formación de un eco, proporcional a su $\Omega_1^{(1)}$. De esta manera se obtiene un conjunto de ecos en función de las frecuencias, lo cual se puede considerar como un espectro de la dimensión indirecta F_1 .

La posición de cada eco será proporcional a $\Omega_1^{(1)}$; por tanto, el patrón de ecos obtenido será equivalente a un espectro de frecuencias de la dimensión indirecta (F_1), para el cual **no** ha sido necesario aplicar la transformada de Fourier, habitual en la RMN tradicional.

La acción del gradiente descrita, es completamente reversible. Así, un segundo gradiente de idéntica magnitud y duración, pero de signo contrario ($-G_a$) rebobinará progresivamente las hélices en sentido contrario, generando nuevamente un espectro de ecos, que será la imagen especular del obtenido con el gradiente positivo.

La implementación de este par de gradientes ($\pm G_a$) devuelve el sistema a su estado de codificación espacial inicial y requiere un tiempo del orden de cientos de microsegundos, típicamente 500 μ s para un campo de 500 MHz y una anchura espectral $SW_2 = 4$ ppm. Por tanto, es posible repetir esta operación de detección a lo largo del tiempo de adquisición, dejando como resultado un tren de ecos y su imagen especular debido a la alternancia de los gradientes (Figura II.25).

Esta característica es de vital importancia en el diseño de un experimento 2D en un único barrido, ya que durante el tiempo de oscilación de $\pm G_a$ los ecos del dominio indirecto también evolucionan de manera envolvente (adquieren una fase) en función del tiempo de adquisición t_2 ,⁶⁷ proporcionando así el desarrollo de las señales a lo largo de la dimensión directa, pues representa su evolución según el desplazamiento químico Ω_2 , tal como se observa en la Figura II.25.

Para ello, se barre el plano ($\Omega_1 - t_2$) y por tanto se puede adquirir el espectro 2D, en un único *scan*. El resultado final es una señal híbrida entre la espectroscopía y la IRM. Por ello, es función tanto de las frecuencias para el dominio indirecto Ω_1 o k ,⁶⁸ como del tiempo t_2 para el dominio directo.

⁶⁷ Durante este tiempo de oscilación de $\pm G_a$, los espines siguen precesando de acuerdo a sus inherentes desplazamiento químicos Ω_2 y por ello los ecos resultantes adquirirán una fase adicional la forma $e^{i\Omega_2 t_2}$.

⁶⁸ k tiene unidades del inverso de la distancia; por eso, en ocasiones se le denomina número de onda y corresponde al espacio recíproco usado en cristalografía de rayos X, llamado *espacio-k*. En este caso el espacio k es una matriz de datos adquiridos, en el que cada línea contiene la información de cada corte en la muestra. Dentro de la adquisición de un experimento de UF-NMR y durante el periodo T_a , el valor de k va cambiando, de modo que dentro del periodo $2T_a$ se completa un barrido de diferentes valores de k , los cuales proporcionarán la información sobre la frecuencia Ω_1 . Con ellos se rellena un espacio (k, t_2) con trayectorias en forma de zig-zag como se observa en la Figura II.26.

Efecto de la alternancia del gradiente de adquisición ($\pm G_a$)

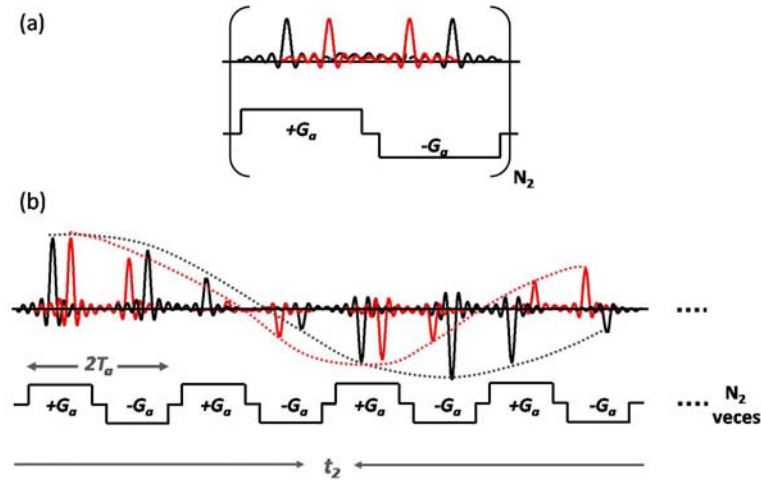


Figura II.25. (a) Mediante la inversión del gradiente de adquisición es posible reenfoque progresivamente las hélices de los espines formadas durante el proceso de codificación espacial. Con ello se consigue un segundo espectro de ecos que será la imagen especular de los ecos obtenidos con el gradiente positivo. (b) Repitiendo la pareja de gradientes oscilantes $\pm G_a$, durante N_2 veces, es posible monitorizar la evolución Ω_2 de los espines, para formar la dimensión directa del espectro UF-NMR 2D.

Como ya se ha comentado, el gradiente de adquisición actúa como una transformada de Fourier analógica en la dirección indirecta t_1 . Para obtener el espectro de UF-NMR a partir de los datos adquiridos $S(k, t_2)$, solo es necesario realizar la transformada de Fourier numérica respecto a la dirección indirecta t_2 .

Dado que el proceso de adquisición está basado en los principios de la metodología EPSI, la digitalización de los datos en presencia de gradientes oscilantes $\pm G_a$ puede representarse por una trayectoria en zigzag (Figura II.26). Los datos así ordenados, no están distribuidos regularmente, lo que sin embargo es necesario para aplicar la transformada de Fourier.

De modo que para resolver este problema, se requiere un reordenamiento de los datos. Tal como se observa en la Figura II.26, este consiste en la separación de las señales adquiridas en dos conjuntos de matrices, en las cuales los datos están equiespaciados entre ellos. Cada conjunto es procedente de los datos adquiridos durante los gradientes positivos, $S_{pos}(k, t_2)$ y negativos, $S_{neg}(k, t_2)$ por separado.

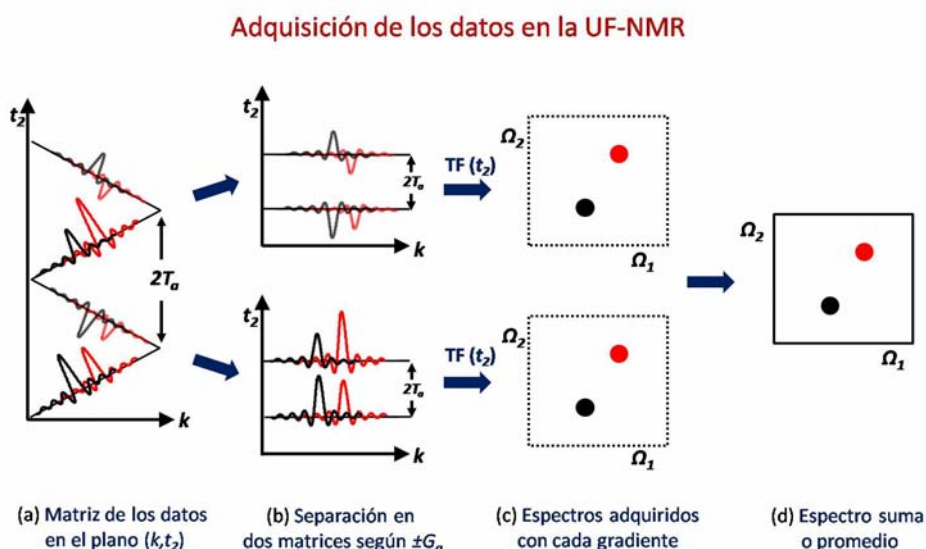


Figura II.26. Representación de cómo los datos son digitalizados durante la etapa de adquisición de un experimento 2D de UF-NMR. Los ecos más difuminados corresponden a los datos adquiridos durante la aplicación del gradiente positivo, $+G_a$, y los ecos más nítidos corresponden a los datos adquiridos durante la aplicación del gradiente negativo, $-G_a$. Dichos datos rellenan el espacio (k, t_2) con trayectorias en forma de zig-zag. Esto hace que los datos no estén almacenados en una matriz regular, lo que no permite aplicar la TF 2D directamente. Si los datos son separados en dos matrices 2D independientes, podrán ser procesados de forma individual. Los espectros así obtenidos podrían ser sumados o promediados para dar lugar a un único espectro con la S/R mejorada.

Así, es posible realizar la transformada de Fourier a lo largo de t_2 , obteniendo dos espectros $I_{pos}(\Omega_1\Omega_2)$ y $I_{neg}(\Omega_1\Omega_2)$. Ambos espectros podrán ser combinados (sumados o promediados) posteriormente para aumentar la relación S/R del espectro final.

En la literatura se han descrito diferentes alternativas para la etapa de adquisición y el proceso de digitalización de los datos.⁶⁹ El procedimiento aquí descrito, se basa en la descripción más general⁷⁰ y es el que se ha empleado en la realización de los experimentos que aborda esta memoria.

⁶⁹ (a) Sela, N.; Degani, H.; Frydman, L. *Magn. Reson. Med.*, **2004**, 52, 893-897. (b) Mishkovsky, M.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2005**, 173, 344-350. (c) Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.*, **2006**, 125, 204507. (d) Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2007**, 186, 352-357.

⁷⁰ Tal, A.; Frydman, L. *Proc. Nuc. Magn. Res. Spect.*, **2010**, 57, 241-292.

II.3.2 Aplicaciones de la UF-NMR

La RMN tradicional, a través de las medidas de diferentes parámetros, permite el estudio de procesos dinámicos que tienen lugar a diferentes escalas de tiempo, tal y como se muestra en la Figura II.27. Por ejemplo, a través de medidas de relajación, es posible el estudio de los movimientos internos del sistema estudiado, los cuales ocurren entre 10^{-7} y 10^{-3} s. Del análisis de la forma de línea de experimentos apropiados de RMN 1D y 2D, se pueden extraer conclusiones sobre cambios conformacionales o acerca de algún intercambio químico que sufra el sistema, cuya escala de tiempo varía entre 10^{-6} y 10^{-3} s. Las transformaciones que tienen lugar a menor velocidad (escalas de tiempo superiores), pueden ser estudiadas siguiendo los cambios de aspecto de los espectros de RMN en función del tiempo.^{71,72} El gran problema reside en que el tiempo necesario para la realización de los experimentos convencionales de RMN 2D, son habitualmente muy superiores a las escalas de tiempo de los sistemas a estudiar.

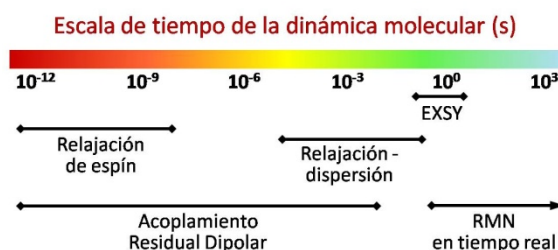


Figura II.27. Escala de tiempo del estudio de procesos dinámicos mediante RMN

Sin embargo, la espectroscopía de UF-NMR permite la adquisición de experimentos de RMN 2D (y en general de RMN nD) en un único barrido, reduciendo drásticamente los tiempos de adquisición. Su empleo ha contribuido por ello, a superar el problema de la resolución temporal de la RMN tradicional. Estas secuencias necesitan tiempos experimentales entre 10^{-1} y 10^1 s. Por tanto, una de las más importantes áreas de aplicación de la espectroscopía de UF-NMR la constituye el seguimiento de procesos transitorios rápidos, como pueden ser la monitorización de especies con cortos tiempos de vida, las conversiones de reactivos en productos en ciertas reacciones químicas rápidas, el intercambio de

⁷¹ Huang, G.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1995**, 92, 6878-6882.

⁷² Ishima R.; Torchia, D.A. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 740-743.

protones lábiles por deuterio, la aparición de diferentes sustancias en la elución de una columna cromatográfica, o la relajación de un núcleo tras una perturbación instantánea, entre otras.

La UF-NMR se ha desarrollado a lo largo de la última década, dejando como legado nuevas aplicaciones en tiempo real en áreas como la química, la biofísica y la IRM *in vivo*. A continuación se describen algunos ejemplos. Es importante resaltar que las contribuciones realizadas por nuestro grupo de trabajo en cuanto a aplicaciones prácticas de la UF-NMR, serán excluidas de este apartado, pues constituyen el tema fundamental de esta Tesis y por tanto, serán comentados en capítulos posteriores.

Una de las primeras aplicaciones exploradas con la espectroscopía de UF-RMN es su utilización como técnica para la **monitorización de transformaciones químicas en tiempo real**. Esto quedó reflejado en el estudio realizado por Frydman y colaboradores⁷³ para el intercambio de $^1\text{H}/\text{D}$ en una muestra de ubiquitina humana (3.2 mM) enriquecida en ^{15}N . Se aplicó para ello una secuencia UF-HSQC $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ (4 scans/UF-HSQC) con buenos resultados. La muestra se preparó fuera del imán, lo que implica un tiempo “muerto” de 30-40 s. Por ello, los intercambios rápidos $< 1\text{s}$ no se pueden observar (Figura II.28). Los datos cinéticos obtenidos (tiempos de vida medios), mostrados en la Figura II.28, acerca del intercambio de los residuos amídicos situados en diferentes posiciones, están en una buena concordancia con los conocidos a partir de experimentos Hadamard HSQC.⁷⁴

De forma análoga, en el mismo trabajo se muestran los resultados obtenidos en el seguimiento de especies transitorias mediante la secuencia UF-TOCSY. Ello ha permitido monitorizar la generación y rápida transformación de los complejos de Meissenheimer i e ii (Figura II.29), a través de la reacción del 3,5-dinitrobenzonitrilo, 125 mM, con metóxido sódico. La reacción se realizó a 16 °C en el interior de un tubo de RMN de 5mm en un espectrómetro de 500 MHz.

La adición del anión metóxido puede tener lugar en la posición 4(i) o en la 2(ii) del anillo bencénico, dando como resultado un espectro TOCSY con un patrón de sustitución diferente para cada caso. En la Figura II.29 se observan algunos espectros representativos del proceso, así como el estudio cinético de la

⁷³ Gal, M.; Mishkovsky, M.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 951-956.

⁷⁴ Bougault, C.; Feng, L.; Glushka, J.; Kupče, E.; Prestegard, J.H. *J. Biomol. NMR.*, **2004**, 28, 385-390.

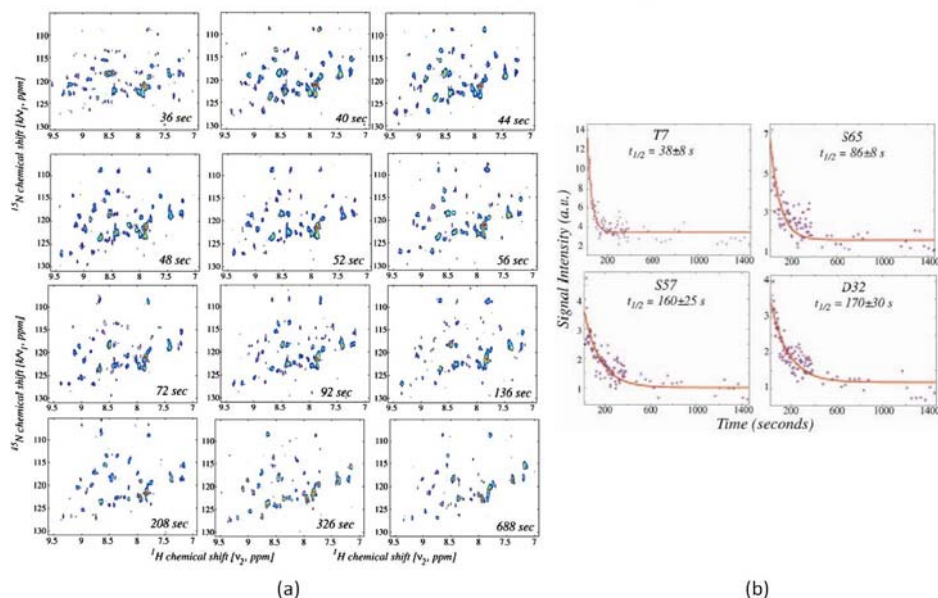
Estudios de intercambio $^1\text{H}/\text{D}$ en la Ubiquitina

Figura II.28. (a) Serie de experimentos 2D UF-HSQC ^1H , ^{15}N correspondientes al estudio del intercambio $^1\text{H}/\text{D}$ en una solución de ubiquitina 3.2 mM. (b) Curvas cinéticas extraídas de las integrales de las señales de los espectros UF-HSQC.

Seguimiento de especies transitorias, complejos de Meisenheimer

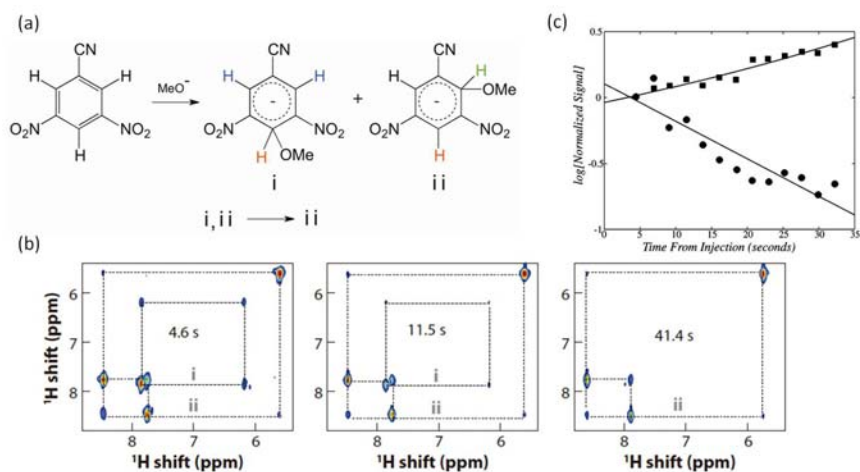


Figura II.29. (a) Esquema de la formación de los complejos de Meisenheimer (b) Espectros UF-TOCOSY representativos del seguimiento de la reacción, (c) mediante la integral de las señales de estos espectros, se puede obtener datos cinéticos de las especies formadas.

interconversión entre los complejos i y ii a lo largo del tiempo, dependiendo de su control cinético o termodinámico. La transformación transcurre en un tiempo inferior a 1 min, lo que da una idea de la excelente capacidad de monitorización de la secuencia UF-TOCSY.

La metodología ultrarrápida también se ha aplicado al estudio de procesos de intercambio correspondientes a la rotación respecto de enlaces en tiempo real.⁷⁵

Recientemente, se ha empleado la secuencia UF-HSQC en el estudio de la mutarrotación de la *D*-glucosa en H₂O.⁷⁶ Esta secuencia emplea gradientes de campo magnético adicionales que permiten observar señales que se encuentran fuera del rango espectral estudiado,⁷⁷ como son algunas correlaciones ¹H,¹³C de cada anómero. Este efecto es conocido como *folding*, debido a que con las manipulaciones adecuadas, es posible “doblar” las señales de interés dentro de la zona del espectro estudiada. Las constantes de mutarrotación para la α -*D*-glucosa y β -*D*-glucosa, calculadas a partir de los valores de las integrales de las señales HSQC obtenidas en función del tiempo, se determinaron con una precisión del 10% (Figura II.30).

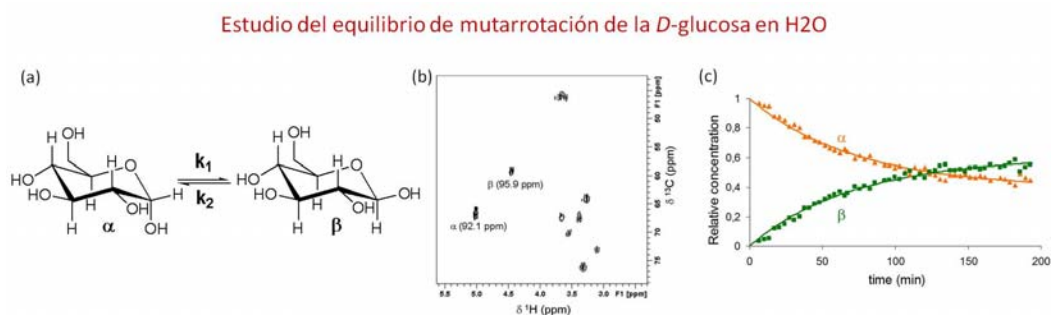


Figura II.30. (a) Esquema del equilibrio de mutarrotación de la *D*-glucosa disuelta en H₂O. (b) Espectro UF-HSQC de la disolución, en la que se observan las señales correspondiente a cada anómero. Este experimento se ha adquirido en un espectrómetro de 400 MHz, con 16 *scans* en un tiempo total de 1 min 22 s. (c) En este gráfico se observa la evolución de la concentración de las especies con respecto al tiempo, el cual revela que el equilibrio de las dos especies anoméricas se logra en un tiempo aproximado de 3 horas y permite el cálculo de las constantes de mutarrotación para la α -*D*-glucosa y β -*D*-glucosa.

⁷⁵ Saphira, B.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2003**, 165, 320-324.

⁷⁶ Giraudeau, P.; Lemeunier, P.; Coutand, M.; Doux, J.M.; Gilbert, A.; Remaud, G.S.; Akoka, S. *J. Spectrosc. Dyn.*, **2011**, 1: 2.

⁷⁷ Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2010**, 205, 171-176.

La identificación de intermedios de reacción en el seguimiento o monitorización de reacciones químicas en tiempo real, es un aspecto de gran importancia mecanística y que puede ser abordado por la espectroscopía de UF-NMR. Además de las importantes contribuciones que en este sentido aporta esta memoria, cabe destacar el estudio de la monitorización en tiempo real sobre la hidrólisis del acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano empleando UF-HSQC.⁷⁸ En este estudio se caracteriza la presencia de los productos inicial y final, así como la presencia de un intermedio hemiacetálico (rojo en la Figura II.31), del cual es bien sabido que posee cortos tiempos de vida. Análogamente al sistema estudiado con anterioridad, la secuencia de pulsos aquí planteada, emplea técnicas de *folding*. Así, es posible observar las señales ^1H , ^{13}C del grupo CH del intermedio *doblándolas* de manera controlada dentro de la zona visible del espectro.

Seguimiento de la hidrólisis del 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano

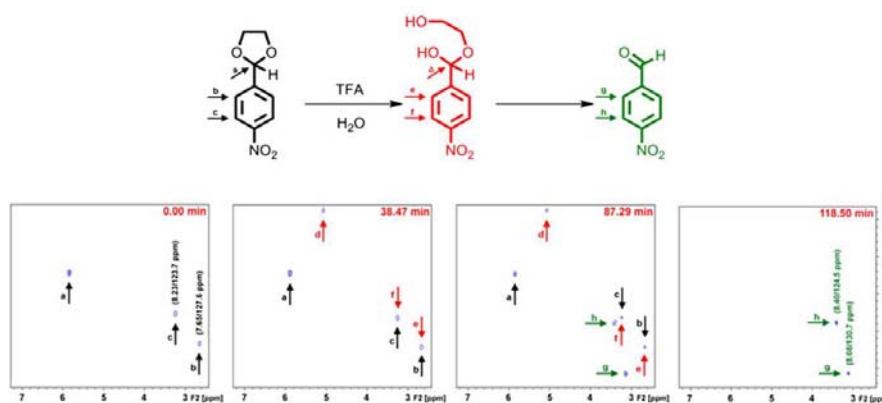


Figura II.31. (arriba) Esquema de la reacción de hidrólisis del acetal 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioxolano, en negro, en presencia de ácido trifluoroacético (TFA). Se muestra la estructura hemiacetálica intermedia formada, en rojo y en verde el aldehído final. (abajo) Espectros UF-HSQC registrados en el transcurso de la reacción. Estos espectros fueron adquiridos en un espectrómetro de 400 MHz, con una concentración inicial de acetal de 440 mM, 8 *scans*, en un tiempo total de 41 s.

La versatilidad de la espectroscopía de UF-NMR ha quedado adicionalmente de manifiesto dada su capacidad de ser **combinada** fácilmente **con otras técnicas rápidas de RMN** emergentes, como la espectroscopía Hadamard,⁷⁹ o la

⁷⁸ Queiroz Jr, L.H.K.; Giraudeau, P.; dos Santos, F.A.B.; de Oliveira, K.T.; Ferreira, A.G. *Magn. Reson. Chem.*, **2012**, *50*, 496-501.

⁷⁹ Tal, A.; Shapira, B.; Frydman, L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 2732-2736.

espectroscopía de Proyección-Reconstrucción.^{80,81} También es posible el acoplamiento con otras secuencia como la SOFAST-NMR, que produce una rápida relajación de los espines y reduce por tanto el tiempo de espera entre los diferentes *scans* manteniendo la sensibilidad. El conjunto ha dado origen así a la denominada espectroscopía UltraSOFAST, con la que ha sido posible optimizar el estudio del intercambio $^1\text{H}/\text{D}$ de la ubiquitina 2mM en disolución y recalcular el tiempo de vida media de dicho intercambio.^{82,83} Igualmente se han realizado estudios acerca del plegamiento de proteínas y de la actuación de interruptores moleculares.⁸⁴

Recientemente se ha demostrado que también es viable la **combinación de secuencias 2D UF-NMR y de técnicas de tiempo compartido** como la secuencia de adquisición en paralelo PANSY. Para ello es necesario disponer de equipos de RMN dotados de receptores múltiples, lo que permite la adquisición simultánea de dos o más señales pertenecientes a núcleos diferentes, dando lugar la denominada 2D PUF SY (2D Parallel UltraFast Spectroscopy).⁸⁵

Esta secuencia se ha aplicado en la adquisición en paralelo y en un único *scan* de espectros 2D de correlación homo ($^1\text{H}, ^1\text{H}$) y heteronucleares ($^1\text{H}, \text{S}$), involucrando diferentes núcleos, por ejemplo ^{19}F y ^{31}P . En la Figura II.32 se observan los espectros UF-COSY $^1\text{H}, ^1\text{H}$ y el de correlación heteronuclear $^1\text{H}, ^{19}\text{F}$ obtenidos.

Aunque el uso de receptores múltiples, necesarios para esta técnica, se encuentra cada vez más extendido, todavía no constituye un estándar en los equipos de resonancia comerciales.

⁸⁰ Mishkovsky, M.; Kupče, E.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.*, **2007**, 127, 034507.

⁸¹ Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2011**, 209, 352-358.

⁸² Gal, M.; Schanda, P.; Brutscher, B.; Frydman, L. *J. Am Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1372-1377.

⁸³ Gal, M.; Kern, T.; Schanda, P.; Frydman, L.; Brutscher, B. *J. Biomol. NMR.*, **2009**, 43, 1-10.

⁸⁴ Lee, M.; Gal, M.; Frydman, L.; Varani, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2010**, 107, 9192-9197.

⁸⁵ Donovan, K. J.; Kupče, E.; Frydman, L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1-5.

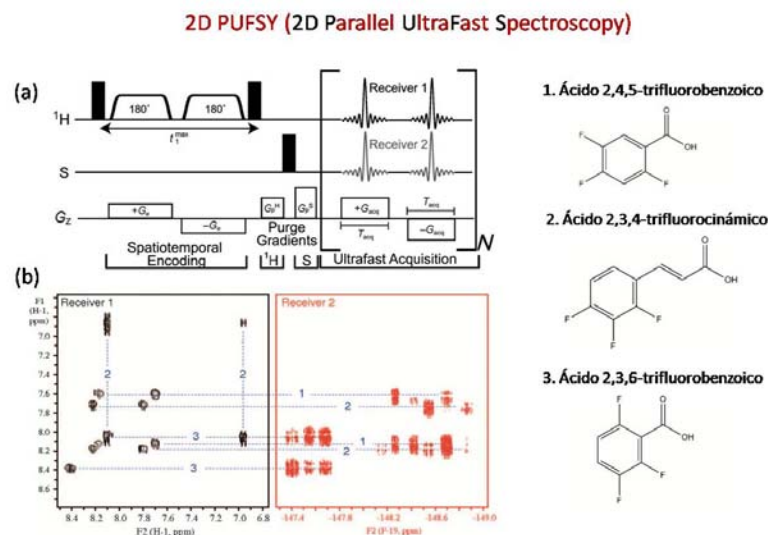


Figura II.32. (a) Secuencia de pulsos 2D PUFYSY que emplea múltiples receptores. (b) La secuencia se ha aplicado a la obtención en paralelo, en un único *scan*, de espectros UF-COSY ^1H , ^1H (en negro) y correlaciones heteronucleares ^1H , ^{19}F (en rojo), a partir de una mezcla de ácido 2,3,6-trifluoro benzoico, ácido 2,3,4-trifluoro cinámico y ácido 2,4,5-trifluoro benzoico

La espectroscopía de UF-NMR también ha sido aplicada con gran éxito al **estudio de muestras hiperpolarizadas**, con las que se obtiene una gran mejoría de la sensibilidad respecto a la RMN tradicional. Se debe recordar aquí que la baja sensibilidad de la RMN es debido a la pequeña diferencia energética entre los estados de los espines nucleares, lo que ocasiona que haya una similitud entre sus poblaciones en condiciones de equilibrio térmico. Esto tiene como consecuencia que en muchas ocasiones su aplicabilidad se encuentre restringida.

Las técnicas de hiperpolarización como la polarización nuclear dinámica *ex situ*, DNP (*Dynamic Nuclear Polarization*), consiguen aumentar la diferencia de poblaciones entre el estado fundamental y el excitado, lo que da lugar a un gran aumento de intensidad de la señal de resonancia en relación a la alcanzada en condiciones de equilibrio térmico.^{86,87} Los sistemas de DNP buscan transferir la alta polarizabilidad de los electrones desapareados de ciertas moléculas a los espines nucleares, a través de las interacciones que se establecen entre los radicales y los núcleos atómicos cuando se saturan los niveles de resonancia paramagnética electrónica mediante radiación de microondas.

⁸⁶ Ardenkjær-Larsen, J.H.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2003**, *100*, 10158-10163.

⁸⁷ Günther, U.L. *Top. Curr. Chem.*, **2013**, *335*, 23-69.

Un equipo para DNP-NMR consta de un polarizador en el que se produce la polarización de la muestra en un imán de 3.5 T, a 1-2 K, mediante la acción de diferentes moléculas radicálicas estables (Figura II.33). Se irradia la mezcla con microondas a 94 GHz durante un tiempo (60 - 90 min) y la muestra hiperpolarizada se transfiere al equipo de RMN de alta resolución, para realizar el experimento, tal y como se observa en la Figura II.33. Esta técnica permite un aumento de la sensibilidad espectacular equivalente a 10^5 *scans*.

Así, la DNP ofrece la posibilidad de adquirir espectros de RMN de muestras de concentración muy baja (< 1 mM), debido al aumento de la señal de resonancia producida por la hiperpolarización. Sin embargo, dado que la polarización se lleva a cabo a temperaturas criogénicas (1-2 K), tras ella, es necesario descongelar la muestra y además transferirla al equipo de RMN. Estos aspectos constituyen claros inconvenientes, puesto que la polarización se pierde rápidamente y no es posible adquirir varios *scans* de intensidad comparable. Por tanto, se convierte en un técnica de difícil compatibilidad con la mayoría de los experimentos de RMN 2D tradicional.

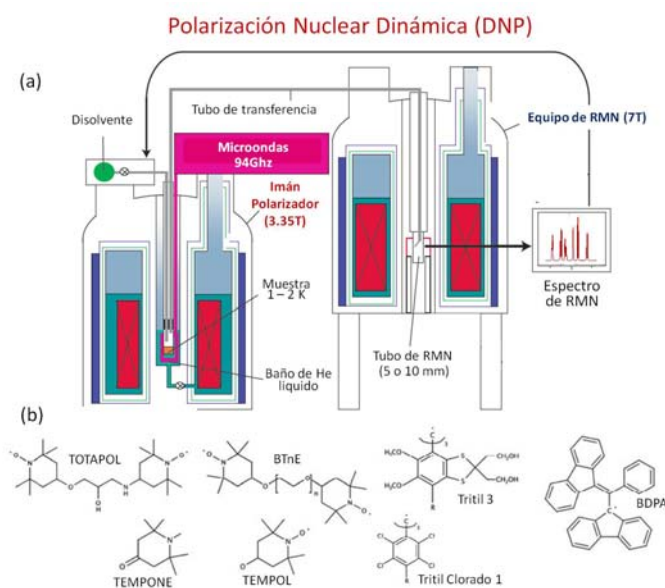


Figura II.33. (a) Diagrama esquemático del equipo empleado en las medidas de DNP. La muestra inicialmente se polariza a 1-2 K (izquierda) y luego es transferida al equipo de RMN (derecha), donde se adquiere el espectro. (b) Se muestran las estructuras químicas de diferentes especies radicálicas empleadas en DNP para polarizar la muestra estudiada.

La combinación de las técnicas de codificación espacial UF-NMR y DNP parece ser una alternativa muy interesante, pues teóricamente tienen la capacidad de superar los inconvenientes más relevantes en la RMN: largos tiempo de adquisición y baja sensibilidad. Así, se han descrito diferentes experimentos que muestran que cuando la DNP es adecuadamente combinada con la espectroscopía de UF-NMR, es posible adquirir espectros de RMN 2D de muestras a concentraciones submicromolares en una fracción de segundo. Entre ellos se encuentra la aplicación de la secuencia 2D ^1H , ^{13}C UF-HSQC a una muestra de piridina 0.47 mM no enriquecida, polarizada mediante un sistema DNP.⁸⁸ Posteriormente se extendió a la aplicación de otras secuencias heteronucleares ^1H , ^{13}C y ^1H , ^{15}N como UF-HMQC y UF-HMBC.^{89,90} En ellas se puede observar que las mejoras en la sensibilidad son superiores para el ^{13}C en comparación con el ^{15}N . Asimismo, se han realizado estudios con una secuencia de selección espacial homonuclear COSY a una muestra 1.5mM del dipeptido Alanina-Glutamina.⁹¹

Combinación de UF-NMR y técnicas de hiperpolarización, DNP

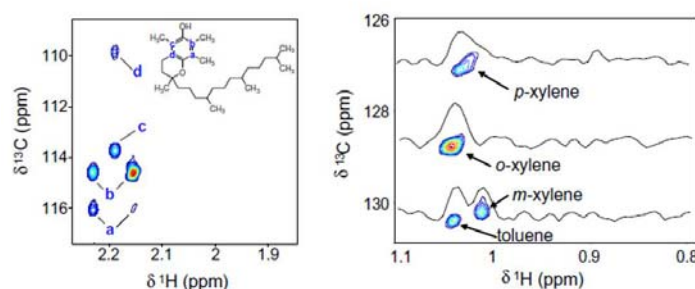


Figura II.34. (izquierda) Espectro UF-HMBC de una muestra de vitamina E hiperpolarizada, con una concentración de 12mM. (derecha) Espectro UF-HMBC de una mezcla de disolventes 1:1:1:1 tolueno/xileno en metanol con una concentración 0.1mM. El proceso de hiperpolarización requiere un tiempo de 90 min.

En general, se ha observado que esta combinación de técnicas ofrece un aumento de la señal que resulta idóneo para las secuencias de UF-NMR, ya que así se compensa su menor intensidad de señal en comparación con la de las correspondientes secuencias tradicionales.

⁸⁸ Frydman, L.; Blazina, D. *Nature Physics*, **2007**, 3, 415-419.

⁸⁹ Mishkovsky, M.; Frydman, L. *ChemPhysChem*, **2008**, 9, 2340-2348.

⁹⁰ Giraudeau, P.; Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 13902-13903.

⁹¹ Panek, R.; Granwehr, J.; Leggett, J.; Köckenberger, W. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, 12, 5771-5778.

Otro tipo de espectros de RMN 2D que se pueden obtener en un único barrido mediante la UF-NMR, son los **espectros 2D *J*-resueltos**.^{92,93} Se emplea para ello un esquema de codificación continua modulada en fase,⁹⁴ y se modifica la detección para suprimir la evolución de los desplazamientos químicos.

Hasta el momento se han logrado adquirir espectros tanto homo como heteronucleares 2D *J*-resueltos en un sólo barrido,^{95,96} mostrando así la capacidad de la UF-NMR para determinar constantes de acoplamiento de manera directa, tal como se observa en la Figura II.35.

UF-NMR y la espectroscopía *J*-Resuelta

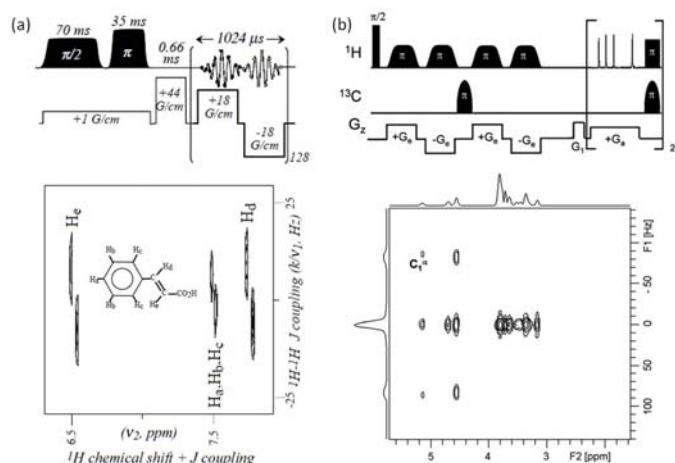


Figura II.35. Secuencia de pulsos y espectro (a) homonuclear 2D UF-*J*-resuelto adquirido para el ácido cinámico, en el cual es posible discernir claramente el patrón de acoplamiento de los protones tanto aromáticos como olefínicos. (b) heteronuclear 2D UF-*J*-resuelto para una solución de 1:1 de [1- ^{13}C]-glucosa y glucosa no marcada isotópicamente. En ambos casos los espectros son adquiridos en un único barrido. La dimensión directa refleja los desplazamientos químicos y la dimensión indirecta los acoplamientos ^1H , ^1H y ^1H , ^{13}C respectivamente.

Recientemente se han propuesto nuevos esquemas para lograr experimentos 2D *J*-resueltos ultrarrápidos.⁹⁷ Esta metodología ha sido asimismo aplicada en

⁹² Esta técnica desarrollada en los inicios de la RMN tradicional, tiene como objetivo principal separar los desplazamientos químicos de los acoplamientos escalares en dos dimensiones diferentes, permitiendo examinar cada parámetro por separado, por tanto, simplificar la apariencia de muchos espectros de RMN en los cuales exista solapamiento de las señales y sus acoplamientos.

⁹³ Aue, W.P.; Bartholdi, E.; Ernst, R.R. *J. Chem. Phys.*, **1976**, 64, 4226-4227.

⁹⁴ Tal, A.; Shapira, B.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2005**, 176, 107-114.

⁹⁵ Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2008**, 190, 339-345.

⁹⁶ Pathan, M.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *J. Magn. Reson.*, **2012**, 214, 335-339.

⁹⁷ Chen, H.; Zhang, Z.; Wang, K.; Cai, S.; Chen, Z. *Chem. Phys. Lett.*, **2013**, 587, 99-104.

experimentos 3D, con el fin de alcanzar mayores niveles de discriminación entre las señales de los diferentes metabolitos presentes en una mezcla.⁹⁸

Dentro del contexto de las **aplicaciones analíticas de la UF-NMR**, denominada ufo-qNMR (*ultrafast optimized quantitative NMR*), cabe destacar el empleo de las secuencias ultrarrápidas en el análisis cuantitativo de muestras complejas como puede ser las biológicas. Un ejemplo lo constituye la determinación de la concentración de metabolitos⁹⁹ con buenos resultados en cuanto a la robustez, exactitud y precisión de estos experimentos. También se ha empleado en la determinación del enriquecimiento de ¹³C en muestras biológicas en 2D y 3D.¹⁰⁰ En todos estos experimentos se ha evidenciado la necesidad de promediar las señales, es decir, resulta necesario realizar más de un único *scan* con el fin de obtener límites de detección y de cuantificación aceptables.

Otra aplicación analítica de la UF-NMR consiste en la **monitorización en tiempo real de diferentes analitos sujetos a un flujo continuo**. Así, por ejemplo se ha empleado una mezcla de compuestos sometidos a una cromatografía líquida en continuo (HPLC) para su separación. En los sistemas de HPLC acoplados a un sistema de RMN, por lo general se adquieren experimentos de RMN 1D. Aunque fuera deseable adquirir espectros RMN 2D, que permiten una mayor resolución espectral, en especial cuando se trata de mezclas complejas, no es posible debido a que llevan asociados altos tiempos de adquisición, haciéndolos incompatibles con sistemas que trabajan de forma continua y que requieran adquisiciones cortas en tiempo real.

La introducción de la UF-NMR como técnica de monitorización, que permite el registro de RMN 2D en 1 *scan*, ofrece las características y resultados adecuados. Así, aplicando las secuencias de pulsos UF-TOCSY y UF-COSY se han descrito condiciones experimentales para la implementación *on line* HPLC/UF-NMR.^{101,102}

⁹⁸ Roussel, T.; Giraudeau, P.; Ratiney, H.; Akoka, S.; Cavassila, S. *J. Magn. Reson.*, **2012**, *215*, 50-55.

⁹⁹ (a) Giraudeau, P.; Remaud, G.S.; Akoka, S. *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 479-484. (b) Pathan, M.; Akoka, S.; Tea, I.; Charrier, B.; Giraudeau, P. *Analyst*, **2011**, *136*, 3157-3163. (c) Le Guennec, A.; Tea, I.; Antheaume, I.; Martineau, E.; Charrier, B.; Pathan, M.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, 10831-10837. (d) Martineau, E.; Tea, I.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *NMR Biomed.*, **2012**, *25*, 985-992.

¹⁰⁰ (a) Giraudeau, P.; Massou, S.; Robin, Y.; Cahoreau, E.; Portais, J.; Akoka, S. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 3112-3119. (b) Giraudeau, P.; Cahoreau, E.; Massou, S.; Pathan, M.; Portais, J.; Akoka, S. *ChemPhysChem.*, **2012**, *13*, 3098-3101. (c) Boisseau, R.; Charier, B.; Massou, S.; Portais, J.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 9751-9757.

¹⁰¹ Shapira, B.; Morris, E.; Muszkat, K.A.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 1262-1265.

¹⁰² Queiroz Jr, L.H.K.; Queiroz, D.P.K.; Dhooghe, L.; Ferreira, A.G.; Giraudeau, P. *Analyst.*, **2012**, *137*, 2357-2361.

Esto abre el camino a la utilización de esta metodología en aplicaciones en las que la HPLC-RMN constituye la rutina analítica de elección.

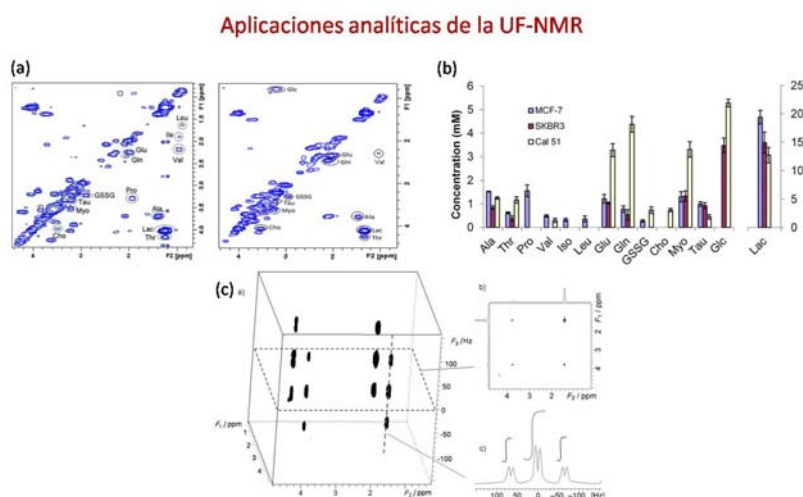


Figura II.36. (a) Espectros COSY ultrarrápido de un extracto de células cancerígenas, adquiridos en 20 min, con 256 *scans* en un espectrómetro de 500 MHz dotado de una criosonda. (b) Se observa la concentración de cada metabolito presente en el extracto de células estudiado. (c) Espectro 3D UF-J-COSY de una muestra de alanina parcialmente marcada, junto con las proyecciones 1D y 2D.

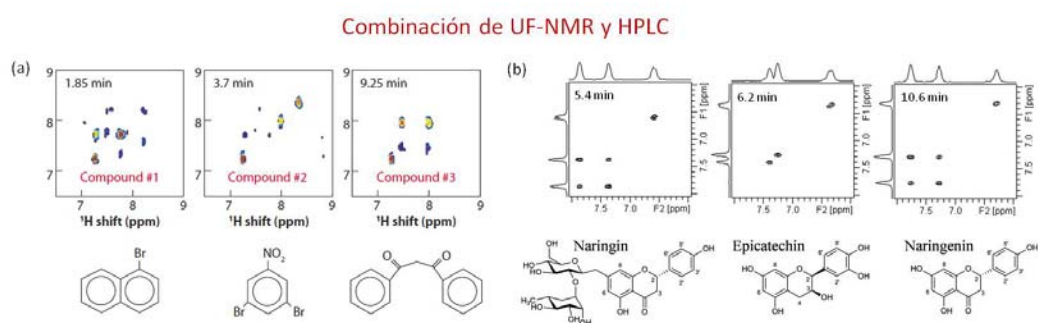


Figura II.37. (a) Espectros UF-TOCSY de la mezcla de los productos mostrados, adquiridos cada 32 s, sujeta a la separación continua mediante una columna cromatográfica. (b) Espectros UF-COSY de la mezcla de productos indicados, adquiridos cada 12 s, durante el transcurso de una cromatografía HPLC-RMN.

Por otro lado, los principios de la codificación espacial empleados en la **UF-NMR** pueden ser **aplicados también en la IRM** (Imagen de Resonancia Magnética). El objetivo va más allá de la caracterización estructural química y busca información de la ubicación espacial de los espines.

Una manera de lograr esto es eliminar el gradiente inverso que se aplica durante la codificación espacial para monitorizar las frecuencias en el dominio indirecto, de modo que la dependencia espacial se conserva. Asimismo, dentro de la UF-NMR se realiza la decodificación de las frecuencias ν_1 mediante la repetición de gradientes bipolares durante la adquisición. Esta decodificación no posee información espacial; sin embargo, si se añade un gradiente en una dirección ortogonal durante la adquisición, es posible codificar la información espacial en dicha dirección.¹⁰³

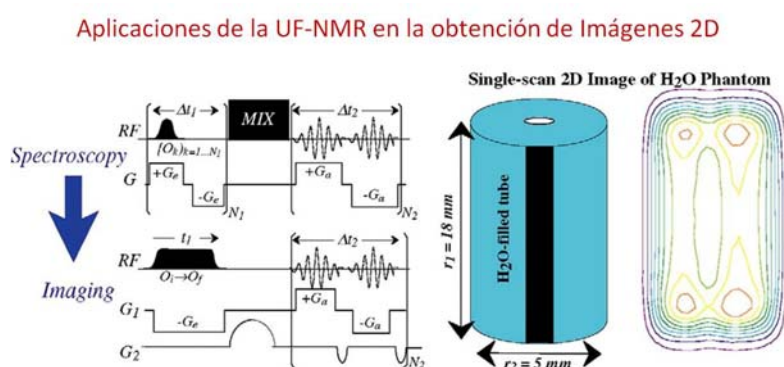


Figura II.38. A partir de la secuencia UF-NMR modificada se obtiene una imagen 2D en un solo barrido.

De este modo es posible adquirir una imagen 2D de resonancia magnética en un solo *scan*. Además, los datos proporcionados por este tipo de imagen se pueden emplear para obtener información espectral, dando como resultado imágenes espectroscópicas obtenidas en un único barrido.¹⁰⁴ Estas, aunque poseen una sensibilidad menor que las imágenes EPI, son menos vulnerables a los cambios de susceptibilidad magnética, lo que las hace adecuadas para el estudio funcional (fMRI) de zonas del cerebro en las que los cambios de susceptibilidad de los tejidos hacen muy difícil el uso de secuencias EPI y de secuencias de eco de gradiente.¹⁰⁵

¹⁰³ Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2005**, 172, 179-190.

¹⁰⁴ Tal, A.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.*, **2007**, 189, 46-58.

¹⁰⁵ Ben-Eliezer, N.; Goerke, U.; Ugurbil, K.; Frydman, L. *Magn. Reson. Imaging.*, **2012**, 30, 1401-1408.

La técnica de **UF-NMR** ha sido aplicada también en la **espectroscopía de resonancia magnética localizada (MRS)**, específicamente en la obtención de espectros 2D COSY localizados (SLCOSY), haciendo posible estudiar tejidos biológicos en menos de 1 min. Con ello, se abre el camino hacia el estudio mediante MRS 2D del análisis *in vivo* y no invasivo de diferentes metabolitos en una amplia variedad de organismos, estudios importantes en la investigación de patogénesis, en técnicas de diagnóstico clínico de varias enfermedades neurológicas, e incluso en el seguimiento de la respuesta metabólica a determinados tratamientos.¹⁰⁶

Por último y de manera muy reciente, se ha aplicado la **UF-NMR en la obtención de medidas de relajación longitudinal T_1** ,¹⁰⁷ que proporcionan información acerca de los alrededores específicos de los núcleos estudiados y sobre la movilidad de fragmentos. A su vez, la movilidad molecular es un parámetro clave que proporciona información sobre propiedades generales como el tamaño y de propiedades dinámicas como la formación de interacciones temporales o agregaciones irreversibles. Estos fenómenos tienen lugar en un amplio rango de tiempos, desde picosegundos hasta microsegundos.

Tradicionalmente, las medidas de T_1 se realizan principalmente mediante métodos de inversión-recuperación (IR); sin embargo, estos métodos no son adecuados para estudiar en tiempo real los cambios que se producen en la estructura de la molécula cuando esta interacciona con su entorno. Por ello, para hacer frente a la necesidad de medidas de pequeños T_1 , se ha propuesto una secuencia de pulsos denominada UF-IR en la que el tiempo de relajación longitudinal se codifica espacialmente (Figura II.39). Con esta técnica resulta posible la monitorización de procesos de complejación y agregación en tiempo real, en un solo barrido y sin restricciones de resolución.

Esta metodología UF-IR se ha aplicado al estudio de la formación de disacáridos a partir de la reacción entre la *D*-xilosa y borato de sodio. Con esta secuencia se logran correspondencias bastante cercanas entre los valores obtenidos por el método tradicional. Como técnica auxiliar, se ha aplicado la secuencia UF-TOCSY para una mayor comprensión de la conectividad de las especies intervinientes en el proceso.

¹⁰⁶ Lin, Y.; Zhang Q.; Wei, Z.; Cai S.; Zhong, J.; Chen, Z. *Mag. Reson. Med.*, **2014**, 71, 903-910.

¹⁰⁷ Smith, P.E.S.; Donovan, K.J.; Szekely, O.; Baías, M.; Frydman, L. *ChemPhysChem*, **2013**, 14, 3138-3145.

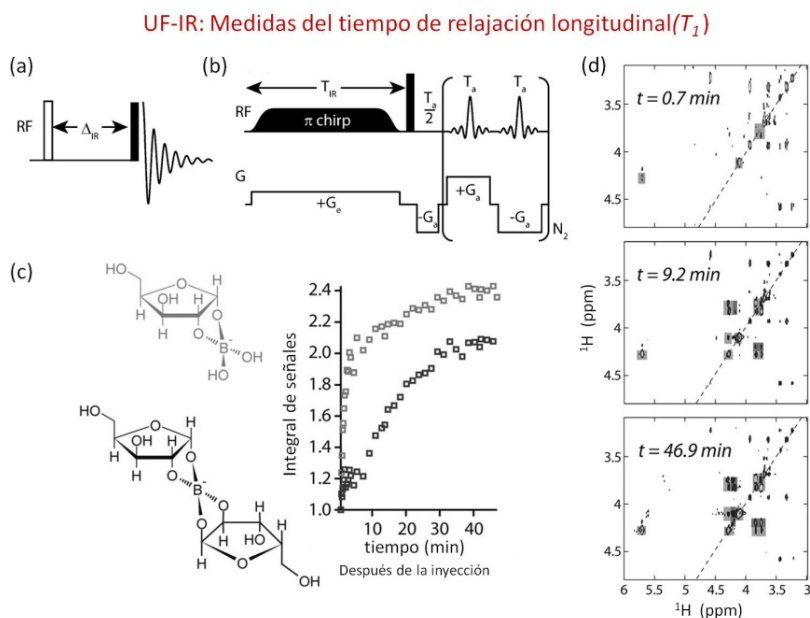


Figura II.39. (a) Experimento convencional empleado en las medidas de T_1 . (b) Secuencia de pulsos UF-IR. (c) Los productos de reacción se observan a la izquierda de la representación gráfica de la integral de las señales para cada uno de los productos finales con respecto al tiempo de reacción. (d) Espectros UF-TOCSY representativos del proceso, adquiridos a 0.7, 9.2 y 46.9 minutos después de la inyección de la sal de bórica.

Finalmente, es posible el poder afirmar que todas estas aplicaciones evidencian que la UF-NMR ha pasado de la etapa de desarrollo metodológico a la de aplicación a sistemas de complejidad creciente,¹⁰⁸ tal como lo demuestran los resultados expuestos en los antecedentes de esta memoria.

¹⁰⁸ Corazza, A.; Rennella, E.; Schanda, P.; Mimmi, M.C.; Cutuil, T.; Raimondi, S.; Giorgetti, S.; Fogolari, F.; Viglino, P.; Frydman, L.; Gal, M.; Bellotti, V.; Brutscher, B.; Esposito, G. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 5827-5835.

II.3.3 Ventajas e inconvenientes de la UF-NMR

La UF-NMR es sin duda una metodología muy prometedora que permite la obtención de espectros 2D (o nD), en tiempos inferiores a 0.2 s, en un único barrido o en un número reducido de ellos.

Una característica importante de esta técnica, derivada de la IRM, siempre y cuando la sensibilidad sea suficiente, es que se puede aplicar para la obtención de una variedad de espectros de RMN nD tanto homo como heteronucleares. Por todo ello, la disponibilidad de un método que permita información tan valiosa en periodos de tiempo tan cortos, puede beneficiar al estudio de una serie creciente de sistemas dinámicos químicos como biológicos.

En el anterior apartado, se han descrito valiosos resultados del empleo de la UF-NMR para el estudio de aspectos relacionados con el mecanismo de las reacciones, sus aplicaciones analíticas cuantitativas y en el seguimiento de moléculas en sistemas de flujo continuo. Se trata además de una metodología compatible con las características técnicas de los equipos de RMN de configuración estándar, que asimismo permite su combinación con otras variantes técnicas conocidas y empleadas en la reducción de los tiempos de adquisición y en la mejora de la sensibilidad de los experimentos 2D de RMN.

Son pues, varias e importantes las ventajas que aporta la UF-NMR, aunque existen también dificultades en su aplicación. En primer lugar, no se trata de una técnica que se encuentre implementada en el extenso panel de secuencias que ofrecen los fabricantes de equipos de RMN. Además, debido a sus diferencias conceptuales con la RMN clásica, no existe un software estándar que permita el cálculo de los parámetros de adquisición en la realización de los experimentos, ni el procesamiento de los datos y el tratamiento de los espectros obtenidos.

En este punto es necesario hacer hincapié que a pesar de las nuevas perspectivas que surgen al considerar las diversas aplicaciones de esta nueva metodología, ello solamente será posible en la práctica si se obtiene suficiente sensibilidad en el experimento ultrarrápido. Éste es apreciablemente menos sensible^{109,110} comparado con el experimento obtenido mediante RMN clásica, debido a la necesidad de muestrear rápidamente varias dimensiones en un único *scan*. Además, es necesario aumentar la anchura de banda del receptor del

¹⁰⁹ Frydman, L. *C.R.Chimie.*, **2006**, 9, 336-345.

¹¹⁰ Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2008**, 192, 151-158.

espectrómetro, lo que produce como consecuencia un aumento en el ruido detectado.

Igualmente es necesario mencionar que la UF-NMR presenta importantes limitaciones en términos de resolución y de amplitud de las ventanas espectrales estudiadas (SW).¹¹¹ Estos aspectos negativos se derivan de su dependencia de los gradientes tanto de excitación (G_e) como de adquisición (G_a) y de las características propias de estos. Por ello, con frecuencia, los espectros ultrarrápidos presenten señales dobladas, así como artefactos ocasionales.

En los últimos años se han desarrollado diferentes mejoras metodológicas que han incrementado significativamente la aplicabilidad de este método.¹¹² Sin embargo, todavía no es posible el poder afirmar que la UF-NMR se trate de una técnica asequible para los no especialistas, incluso disponiendo de todas las herramientas necesarias. Además, no se puede pasar por alto el hecho de que esta técnica es muy exigente con el hardware del espectrómetro, principalmente con el módulo de gradientes, por lo que se deben tomar precauciones que eviten posibles averías.

En resumen, sobre la UF-NMR se puede decir que se trata de una metodología de aplicación complicada, pero que sin lugar a dudas puede aportar resultados únicos.

¹¹¹ Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2008**, *195*, 9-16.

¹¹² (a) Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2008**, *190*, 339-345. (b) Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.*, **2008**, *128*, 164513. (c) Pelupessy, P.; Duma, L.; Bodenhausen, G. *J. Magn. Reson.*, **2008**, *194*, 169-174. (d) Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2010**, *205*, 171-176. (e) Giraudeau, P.; Akoka, S. *Magn. Reson. Chem.*, **2011**, *49*, 307-313.

II.4 Aspectos prácticos en la realización de los experimentos de UF-NMR

II.4.1 Dependencias entre los parámetros de adquisición

En la espectroscopía UF-NMR existe una relación entre los diferentes parámetros de adquisición, derivada de la singularidad de la técnica, que es función del esquema de codificación espacial empleado en la secuencia de pulsos ultrarrápida.¹¹³ Abordaremos estas relaciones, según el esquema de codificación continuo modulado en amplitud. Este esquema se ha utilizado con frecuencia en las secuencias de pulsos UF-NMR aplicadas en el desarrollo de esta Tesis.

En los experimentos ultrarrápidos, los datos no son adquiridos en el plano $(t_1 - t_2)$, sino en el plano $(k - t_2)$, tal como se comentó en el apartado II.3.1.3.

Los datos obtenidos a lo largo del eje t_2 (dimensión directa) se muestrean del mismo modo que en la RMN convencional, por lo que la resolución, $\Delta\nu_2$ y la anchura espectral, SW_2 son similares. Es decir, la resolución espectral estará definida por el tiempo de adquisición máximo en esta dimensión: $t_2^{max} = 2N_2T_a$, donde N_2 y T_a es el número de repeticiones de los gradientes de adquisición y el tiempo de aplicación de los mismos respectivamente. Por tanto $\Delta\nu_2$ tras la transformada de Fourier es igual a:

$$\Delta\nu_2 = 1/2N_2T_a \quad (1)$$

Y la anchura espectral estará descrita por:

$$SW_2 = 1/2T_a \quad (2)$$

El cálculo de los parámetros del eje k (dimensión indirecta) es algo diferente. Como se comentó en el apartado II.3.1.2, se emplean pulsos de excitación *chirp* para codificar espacialmente las frecuencias de la muestra, es decir para generar la dimensión indirecta.

La resolución espectral en esta dimensión, $\Delta\nu_1$, está definida por el tiempo de aplicación de los pulsos *chirp*, T_e , el cual corresponde a la mitad del tiempo de codificación espacial, $T_e = t_1^{max}/2$; es decir que:

$$\Delta\nu_1 = 1/t_1^{max} \quad (3)$$

¹¹³ Tal, A.: Frydman, L. *Prog. Nuc. Magn. Reson.*, **2010**, 57, 241-292.

Por tanto, T_e posee una influencia inmediata en la resolución del espectro en la dimensión indirecta. Asimismo, estos parámetros afectan al valor de SW_1 que se define como:

$$SW_1 = \left| \frac{\Delta\Omega_{RF}\gamma_a G_a T_a}{2\gamma_e G_e T_e} \right| \quad (4)$$

donde γ_a y γ_e son las constantes giromagnéticas de los núcleos involucrados en la adquisición y la excitación respectivamente, las cuales sólo serán diferentes en el caso de experimentos heteronucleares. G_a , T_a y G_e , T_e son la intensidad y el tiempo de aplicación de los gradientes de adquisición y excitación respectivamente y $\Delta\Omega_{RF}$ es el ancho de banda del pulso de excitación (el rango de frecuencias que es capaz de barrer el pulso chirp).

En los experimentos ultrarrápidos el número de pasos o puntos en la dirección t_1 , conocido como N_1 , es muy pequeño. Este valor se puede calcular a partir de los datos de la anchura y de la resolución espectral en esta dimensión. En el caso del experimento modulado en amplitud N_1 es:

$$N_1 = \frac{SW_1}{\Delta\nu_1} = \frac{\gamma_a G_a T_a \Omega_{RF}}{\gamma_e G_e}$$

Por otro lado, $\Delta\Omega_{RF}$, influye en la longitud, L , de la muestra afectada por la codificación espacial según: $\Delta\Omega_{RF} = \gamma_e G_e L$. Esta longitud debe ser lo más aproximada a la longitud real de la muestra para evitar que haya partes de ella que no sean irradiadas o que se irradien zonas donde no haya muestra. Además, $\Delta\Omega_{RF}$ debe ser mucho mayor que la anchura espectral en esta dimensión, SW_1 , para evitar pérdidas y distorsiones.

De la ecuación (4) se deduce que es posible conseguir la misma anchura espectral SW_1 con diferentes pulsos chirp (cada uno con un valor de $\Delta\Omega_{RF}$ y T_e diferente). Sin embargo, para cada pulso será necesario ajustar otros parámetros de la secuencia, como por ejemplo, la intensidad de los gradientes de codificación, G_e , que influye en la fracción de la muestra afectada por la codificación espacial, L . También es necesario ajustar la intensidad o duración del gradiente de adquisición, G_a y T_a , teniendo en cuenta que G_a está limitado por el valor máximo posible del sistema de gradientes usado en el experimento y que T_a define directamente el valor de la anchura espectral en la dimensión directa, según la ecuación (2).

Una manera de visualizar de manera práctica la dependencia entre los diferentes parámetros de adquisición en los experimentos de UF-NMR es afrontar la resolución de un problema común, como puede ser mejorar la calidad del espectro ultrarrápido, aumentando la resolución espectral en alguna de las dimensiones, por ejemplo la indirecta ($\Delta\nu_1$).

Para aumentar $\Delta\nu_1$, se requiere un mayor tiempo de codificación espacial, T_e ; sin embargo, valores superiores de este tiempo hacen que: (i) la relación S/R disminuya debido a las pérdidas de la intensidad de la señal como consecuencia de efectos de relajación o difusión molecular (estos ocurren mientras los espines se encuentran en el plano transversal),^{114,115} (ii) distorsiones de las señales del espectro y finalmente y de manera más evidente, (iii) se produce una disminución del valor de la anchura espectral, SW_1 .

Para conseguir mantener el valor de SW_1 es necesario aumentar el valor del gradiente de decodificación, G_a (ver ecuación 4), lo que podría llevar a valores que comprometan la seguridad de la sonda. Asimismo, valores elevados de este gradiente pueden producir pérdidas de la señal por difusión. Otra posible solución sería el aumento del valor del tiempo de adquisición, T_a . Sin embargo, esto daría lugar a una disminución de la anchura espectral en la dimensión directa, SW_2 .

Por otro lado, en el seguimiento de procesos dinámicos como las reacciones orgánicas, se requieren anchuras espectrales amplias, que puedan abarcar las zonas donde posiblemente se observen especies de interés. Como se ha comentado anteriormente, en la UF-NMR se presentan limitaciones importantes en cuanto al tamaño espectral en ambas dimensiones. Los valores de SW_1 y SW_2 dependen de la duración e intensidad de los gradientes de excitación y adquisición.

Sin embargo existen varias alternativas, si bien todas ellas plantean ciertos compromisos. El modo de conseguirlo es: (i) disminuir la duración del gradiente de adquisición, lo que produciría una disminución del número total de puntos adquiridos y por tanto a una disminución de la resolución; (ii) aumentar la

¹¹⁴(a) Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2008**, 195, 9-16.; Shrot, Y. (b) Frydman, L. *J. Chem. Phys.*, **2008**, 128, 164513.

¹¹⁵ Se ha comprobado que por lo general, manteniendo los valores del tiempo de codificación por debajo de 50 ms, las pérdidas debidas a la difusión son tolerables.

intensidad del gradiente de adquisición. Hay que tener en cuenta que el valor máximo de la intensidad del gradiente que se puede alcanzar, depende de la instrumentación particular de cada espectrómetro. Por otro lado, este aumento conlleva varios efectos: gradientes más intensos producen mayores distorsiones de fase y de la forma del propio gradiente, efectos más acusados de las corrientes de *eddy*¹¹⁶ y mayores desajustes entre gradientes positivos y negativos; (iii) disminuir el valor del gradiente de excitación. En este caso el límite inferior es la longitud de la muestra, ya que, para el mismo rango espectral del pulso de RF, gradientes con menor intensidad dan lugar a la selección de una longitud espacial mayor; (iv) aumentar el tiempo t_1^{max} de la codificación espacial. Como se comentó anteriormente, este caso podría producir una reducción de la relación S/R debido a la pérdida de la señal por difusión y al aumento del tiempo en el que actúa la relajación T_2 .

II.4.2 Programas de pulsos y herramientas informáticas

Como se ha expuesto previamente, la UF-NMR no es una técnica que se encuentre implementada en el extenso panel de secuencias que ofrecen los fabricantes de equipos de RMN. Por ello y debido a sus diferencias conceptuales con la RMN clásica, se hace necesario diseñar además de la secuencia de pulsos, el programa que permita el cálculo de los diferentes parámetros de adquisición y el software necesario para el procesado y tratamiento de los datos (obtención del espectro).

Durante los últimos años, en nuestro grupo de investigación se ha venido desarrollado un trabajo experimental muy extenso que ha dado como resultado una variedad de programas de pulsos necesarios para la realización de diferentes tipos de experimentos 2D de UF-NMR y que han sido implementados en los espectrómetros de 500 y 700 MHz del CAI de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid. Asimismo, se han desarrollado programas informáticos que permiten tanto el cálculo de los parámetros de adquisición, como la obtención de espectros con los datos adquiridos.¹¹⁷

¹¹⁶ Los cambios rápidos del campo magnético producidos por la aplicación de gradientes, generan corrientes inducidas en los componentes conductores que rodean a la muestra (soporte de la sonda de RF, bobinas de *shim*, etc.) que dan lugar a gradientes espurios.

¹¹⁷ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

En el desarrollo de esta Tesis se han empleado las secuencias de pulsos UF-TOCSY, UF-COSY, UF-HSQC, UF-HMBC tanto para correlaciones ^1H , ^{13}C como ^1H , ^{31}P . Todas y cada una de ellas tienen la posibilidad de ser empleadas de manera dinámica, es decir que pueden ser repetidas el número de veces que se requiera durante el transcurso de la reacción estudiada. De manera especial también se desarrolló y aplicó una secuencia de pulsos combinada, denominada UF-TOCSY-HMBC, la cual permite la detección de correlaciones homo y heteronucleares en el mismo experimento. Todas ellas se encuentran descritas a lo largo de la discusión de esta memoria y los programas de pulsos en el apéndice de la misma.

El programa **paramadq**, diseñado en nuestro grupo, se ha utilizado en el cálculo de los parámetros de adquisición para cada uno de los experimentos UF-NMR. Ha sido escrito empleando el lenguaje de programación Matlab 7.11 (Mathworks, EEUU). Este software permite de manera interactiva y mediante una interfaz gráfica, tal y como se observa en la Figura II.40, calcular los parámetros de adquisición de la secuencia en función del tipo de núcleo a estudiar y de las anchuras espectrales deseadas.

Programa para el cálculo de parámetros de adquisición

The screenshot shows a MATLAB window titled 'paramadq' with a yellow, green, and cyan background. It contains several input fields and calculated results:

Parameter	Value
Frecuencia del espectrómetro (MHz):	500.13
Núcleo:	^1H
Gradiente máximo (G/cm):	53.5
Longitud de la sonda (cm):	1.8
Gradiente de excitación (%):	10.0
Ancho de banda del pulso adiabático (KHz):	50.0
Z efectivo / Z maximo:	1.2217
Anchura espectral en F2 (ppm):	4.00
Longitud del pulso adiabático (ms):	10.0
rise time (us):	40
Gradiente de adquisición (%):	20
Tiempo de adquisición (us):	209.935
Anchura espectral en F1 (ppm):	2.0988

Figura II.40. Ventana interactiva del programa *paramadq* para el cálculo de los parámetros de adquisición de los experimentos UF-NMR.

El programa requiere establecer previamente los siguientes parámetros: la *intensidad del campo magnético* de trabajo, el *núcleo estudiado* en la dimensión indirecta (^1H , para experimentos homonucleares, ^{13}C , ^{15}N o ^{31}P para experimentos heteronucleares), el valor en G/cm del *gradiente máximo* permitido por la sonda de gradientes empleada, la *longitud de la sonda*, que corresponderá con la longitud máxima de la parte de la muestra excitable. Estos datos se introducen en el primer bloque de la ventana interactiva del programa (color amarillo).

A la izquierda del bloque intermedio (color verde), e inferior (color azul) del programa, se encuentran diferentes valores de entrada: la intensidad del gradiente de excitación y adquisición (G_e y G_a) en porcentajes del gradiente máximo permitido, el ancho de banda del pulso *chirp* ($\Delta\Omega_{RF}$) en KHz, la anchura espectral en la dimensión directa (SW_2) en unidades de ppm, la longitud del pulso *chirp* (T_e) en ms y el tiempo de apagado de los gradientes, necesario para que el programa de pulsos funcione adecuadamente (*rise time*), generalmente igual a 40 μs .

Estas variables se ajustan hasta obtener un valor óptimo de la relación entre la longitud realmente excitada y la longitud de la sonda ($z_{efec}/z_{m\acute{a}x}$), la cual debe ser aproximadamente 1; el valor del tiempo de adquisición (T_a) adecuado para conseguir la anchura espectral deseada en la dimensión directa (SW_2) y finalmente el tamaño de la anchura espectral deseada en la dimensión indirecta (SW_1). Estos parámetros se encuentran a la derecha en los dos bloques inferiores (ver Figura II.40).

Los valores obtenidos mediante el programa **paramadq**, son “trasladados” a la lista de parámetros de adquisición de la secuencia de pulsos UF-NMR, también desarrollada en nuestro grupo, empleando el programa TOPSPIN. Allí, se incorporan adicionalmente otros parámetros comunes a los experimentos tradicionales y ultrarrápidos, como son el tiempo y la potencia del pulso duro de 90° de ^1H , el número de barridos, el tiempo de repetición de la secuencia, etc. Finalmente se adquiere el experimento y se comienza con el procesamiento de los datos.

A diferencia de la RMN tradicional, tampoco se pueden aplicar directamente los programas disponibles en los espectrómetros comerciales para el procesamiento de los espectros de UF-NMR. Por ello resulta imprescindible desarrollar programas

con este fin. Giraudeau y colaboradores han contribuido en este aspecto con el desarrollo de un programa que se basa en el lenguaje de programación *Python* bajo el propio programa TOPSPIN de Bruker¹¹⁸ e igualmente han desarrollado herramientas para mejorar la apariencia de los espectros pre y post procesado.¹¹⁹

En nuestro grupo se ha diseñado y optimizado un software de procesamiento, el cual ha sido empleado en el desarrollo de esta memoria. Consiste en un conjunto de programas que pueden utilizarse en diferentes plataformas, con datos procedentes de distintos espectrómetros y formatos. Funcionan pues de manera independiente del programa comercial de Bruker. El nombre de su versión más reciente es **XprocUFnmr** y al igual que la herramienta de cálculo de parámetros de adquisición, ha sido escrito en lenguaje de programación Matlab 7.11 (Mathworks, EEUU).

Este programa permite realizar, de manera interactiva y mediante una interfaz gráfica, un procesamiento básico previo a la realización de la transformada de Fourier, que mejora tanto la resolución como la relación S/R. Entre las herramientas de procesamiento empleadas, se encuentra la denominada *shearing*,¹²⁰ el llenado con ceros,¹²¹ la predicción lineal y la implementación de filtros, como las funciones de apodización. Todas ellas son aplicables tanto en la dirección t_2 como en la dirección $k(t_1)$.

En el procesamiento de los datos transformados es posible definir de forma interactiva el desplazamiento entre los espectros obtenidos a partir de los datos adquiridos durante los gradientes positivos y negativos, tal y como se comentó en el apartado II.3.1.3. Este ajuste es imprescindible para realizar adecuadamente la suma o el promedio de ambos espectros.

¹¹⁸ Pathan, M.; Cherrier, B.; Tea, I.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *Magn. Reson. Chem.*, **2013**, *51*, 168-175.

¹¹⁹ Rouger, L.; Charrier, B.; Pathan, M.; Akoka, S.; Giraudeau, P. *J. Magn. Reson.*, **2014**, *238*, 87-93.

¹²⁰ El *shearing* es un proceso de corrección de las imperfecciones de los gradientes, concretamente, cuando la intensidad de $+G_a$ no es exactamente igual que la de $-G_a$. Esto ocasiona que las señales a lo largo del eje t_2 no estén alineadas, sino que se desplacen hacia valores de k menores o mayores en cada paso del bucle de adquisición. El efecto sobre el espectro de RMN es una pérdida de resolución.

¹²¹ En este proceso se añaden ceros al final de los datos adquiridos, con lo que se aumenta la resolución espectral en esa dirección

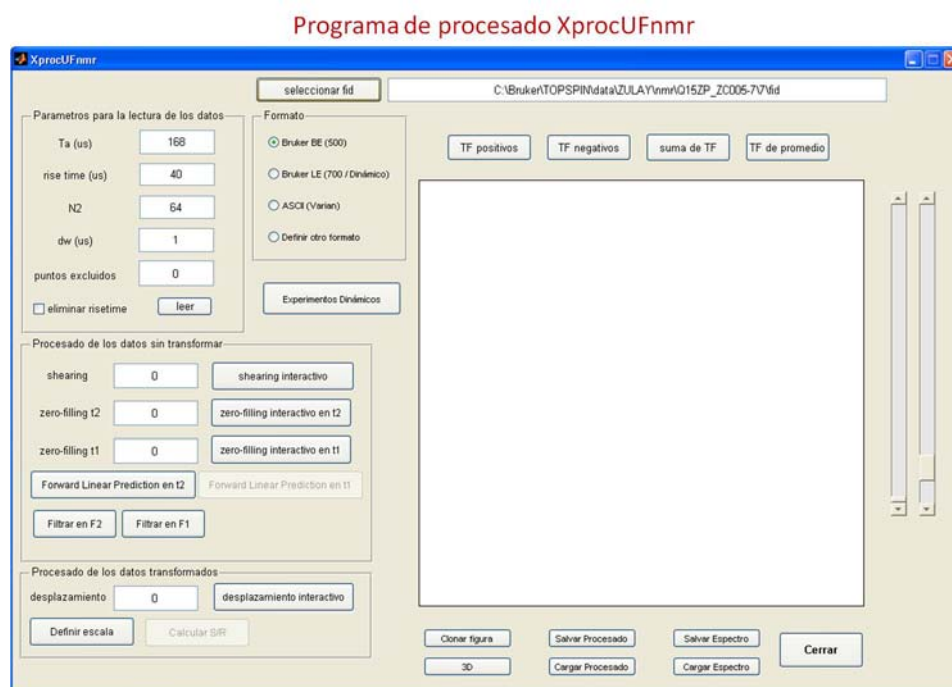


Figura II.41. Ventana principal del programa XproUFnmr para el procesado de los datos obtenidos a partir de UF-NMR.

Igualmente es posible definir y calibrar la escala de frecuencias del espectro, generar, salvar y editar imágenes del espectro final y los pasos intermedios del procesado. Se puede visualizar el espectro en un gráfico tridimensional, salvar los pasos seguidos en el procesado de un experimento en particular y emplearlo posteriormente en el proceso del mismo o de otro espectro.

Finalmente, el programa *XprocUFnmr* permite el procesado de los cientos de espectros resultantes en los estudios de procesos dinámicos, tomando como modelo el realizado en uno de aquellos. Los espectros así transformados pueden incluso presentarse como una secuencia de video, cuya animación refleja en tiempo real los cambios producidos en la reacción o sistema estudiado.

II.5 Monitorización de sistemas dinámicos mediante espectroscopía de RMN tradicional en tiempo real.

La espectroscopía de RMN permite la caracterización de una gran variedad de moléculas en una forma no destructiva, ni invasiva. Incluso a partir de una mezcla de varios componentes, bajo las condiciones experimentales adecuadas, es posible extraer información tanto cualitativa como cuantitativa.

Debido a lo anterior, una de las aplicaciones más interesante y directa se encuentra en el seguimiento de procesos dinámicos de interés químico y bioquímico. A través del estudio de estos procesos ha sido posible obtener información mecanística y cinética en tiempo real. Mediante la acumulación secuencial de espectros de RMN 1D y el estudio del cambio de las integrales de las señales a lo largo del proceso, se ha podido analizar el comportamiento de reacciones químicas que tienen lugar, al menos, en varios minutos.

Un proceso que tiene bastante interés bioquímico es el seguimiento en tiempo real del plegamiento de las proteínas, ya que permite un análisis detallado de algunos conjuntos estructurales que se forman en diferentes etapas del plegamiento, así como conocer el mecanismo y la cinética por los cuales este proceso tiene lugar. Sus escalas de tiempo pueden variar desde milisegundos hasta horas, dependiendo del medio y del tipo de proteína estudiada. La RMN juega un papel significativo, debido a su capacidad de analizar la distribución de hidrógeno y deuterio en sitios lábiles de la proteína, así como para detectar la formación de diferentes estructuras en sitios específicos, como por ejemplo el establecimiento de nuevos enlaces hidrógeno amídicos.

Por todo ello se ha desarrollado una amplia variedad de estrategias para implementar la RMN en el estudio de las reacciones de las proteínas en tiempo real.^{122,123} Particularmente se ha hecho énfasis en el seguimiento de procesos lentos, debido a las dificultades intrínsecas en acumular espectros de RMN con la calidad adecuada en periodos cortos de tiempo. Una de estas aproximaciones realiza la adquisición de una colección de espectros de ¹⁹F-RMN del proceso de dilución de proteínas, en las que se han reemplazado algunos residuos específicos (particularmente los aromáticos) por sus análogos fluorados. En la Figura II. 42 se observan espectros 1D de ¹⁹F-RMN, adquiridos a lo largo de la

¹²² Van Nuland, N.A.J.; Forge, V.; Balbach, J.; Dobson, C.M. *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 773-780.

¹²³ Dobson, C.M.; Hore, P.J. *Nat. Struct. Biol.*, **1998**, *5*, 504-507.

reacción de re-naturalización de la proteína dihidrofolato reductasa (DHFR). Dichos espectros permiten visualizar diferentes estados de la proteína a lo largo del proceso de plegamiento.¹²⁴ Una estrategia similar es posible adquiriendo espectros de RMN 2D, si la reacción a investigar es lo suficientemente lenta, como por ejemplo en el seguimiento del re-plegamiento de la proteína apoplastocianina, la cual, a pH neutro y en ausencia de sales (baja fuerza iónica del medio) se encuentra desnaturalizada. El estudio del plegamiento de esta proteína se realiza adquiriendo espectros ^1H , ^{15}N HSQC, después de incrementar el contenido de Na_2SO_4 desde 0 hasta 0.5 M del medio. Con ellos es posible observar la existencia de estados intermedios, que se forman durante el proceso de naturalización de la proteína, los cuales parecen ser altamente dinámicos, hecho evidenciado por el ensanchamiento apreciable de las señales de los espectros (Figura II.42, b).¹²⁵

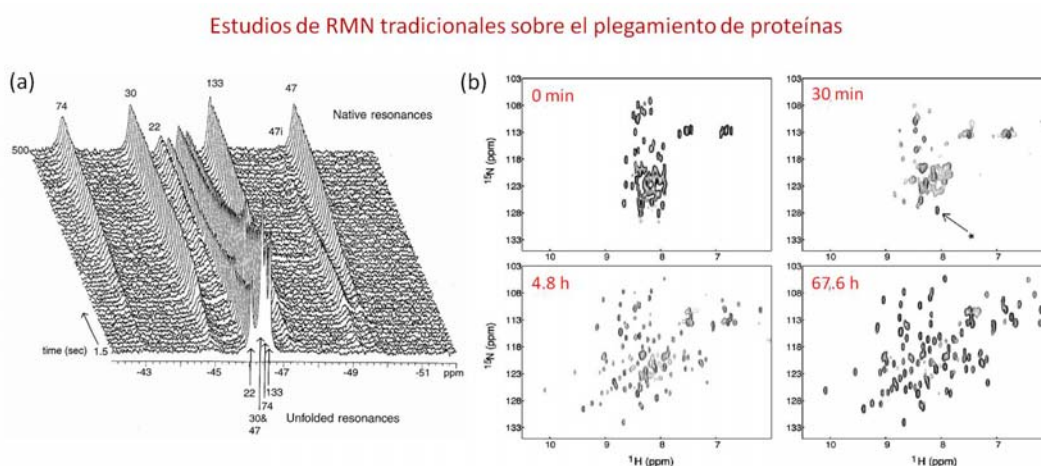


Figura II.42. (a) Espectros de ^{19}F -RMN del proceso de replegamiento de la proteína 6- ^{19}F -triptofano dihidrofolato reductasa, después de la dilución desde 5.5 hasta 2.75 M con una solución de urea a 5°C en presencia de NADP^+ . Se observa la desaparición de señales del estado no plegado y la aparición de otras pertenecientes a la forma nativa de la proteína. Se adquieren 41 espectros por separado para cada dilución. (b) Espectros ^1H , ^{15}N HSQC de la apoplastocianina durante diferentes estados de plegamiento, los cuales se logran aumentando la concentración salina en el medio.

El seguimiento de reacciones biocatalíticas en medio acuoso mediante RMN constituye un método bien establecido en el campo de la biotecnología.^{126,127} De

¹²⁴ Hoetzli, S.D.; Frieden, C. *Biochemistry*, **1998**, 37, 387-398.

¹²⁵ Mizuguchi, M.; Kroon, G.J.; Wright, P.E; Dyson, H.J. *J. Mol. Biol.*, **2003**, 328, 1161-1171.

¹²⁶ Weber, H.; Brecker, L. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, 11, 572-578.

la misma forma, la monitorización de reacciones orgánicas a través de espectros de RMN 1D es una técnica empleada desde hace más de 20 años. Muchos de estas investigaciones abordan el estudio de las reacciones con disolventes protonados¹²⁸ o disolventes no deuterados, para lo que se requiere aplicar técnicas de supresión de señales.¹²⁹

Es importante resaltar que la mayoría de los estudios que emplean la RMN de alta resolución como método de seguimiento de reacciones y dado que estas se llevan a cabo dentro de un tubo de RMN, se encuentran limitados a la pequeña escala. Asimismo, el tipo de procesos estudiados es reducido, ya que un gran número de ellos transcurren en condiciones de presión o altas temperaturas, así como en medios inhomogéneos, lo que implican importantes desafíos que deben ser superados. Con el fin de monitorizar las reacciones desde tiempo cero, ha sido necesario desarrollar procedimientos para la rápida mezcla de los reactivos, dentro del equipo de RMN; a estos se les conoce como métodos de flujo detenido, o de flujo continuo.^{130,131,132} Aún así, no es posible evitar los tiempos “muertos” en los cuales es necesario ajustar el equipo (nivel del *lock*, ajuste de *shims*, etc.).

A pesar de todo, es posible aplicar la RMN en la caracterización de mezclas de reacción complejas, formadas por múltiples compuestos. Un ejemplo de ello es el seguimiento del proceso en cadena de la conversión de la α -tioamida en α -tio- β -cloroacrilamida producido por la *N*-clorosuccinimida (NCS), proceso para el cual ha sido posible abordar su estudio mecanístico (Figura II.43). Algunas de las especies intermedias involucradas han sido aisladas en estudios preliminares, pero la formación de otras especies transitorias no había podido ser demostrada. Sin embargo, la aplicación de la espectroscopía de ¹H-RMN en diferentes disolventes, ha permitido caracterizar y cuantificar *in situ* diferentes especies intermedias, como por ejemplo el ión clorosulfónico, tal y como se observa en la

¹²⁷ Weber, H.; et al. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2002**, 19-20, 149-157.

¹²⁸ Maiwald, M.; Fischer, H.H.; Kim, Y.K.; Hasse, H. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 375, 1111-1115.

¹²⁹ Hoyer, T.R.; Eklov, B.M.; Ryba, T.D.; Voloshin, M.; Yao, L. *Org. Lett.*, **2004**, 6, 953-956.

¹³⁰ Fyfe, C.A.; Cocivera, M.; Damji, S.W.H. *Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 277-282.

¹³¹ Khajeh, M.; Bernstein, M.A.; Morris, G.A. *Magn. Reson. Chem.*, **2010**, 48, 516-522.

¹³² Mix, A.; Jutzi, P.; Rummel, B.; Hagedorn, K. *Organometallics*, **2010**, 29, 442-447.

Figura II.43 y de esta manera, revisar y proponer un mecanismo más acorde con los hechos experimentales.¹³³

Análogamente, se han desarrollado diferentes dispositivos como puedan ser los micro-reactores, que funcionan como sondas detectoras, los cuales permiten el seguimiento de reacciones que se llevan a cabo en pequeños volúmenes e incrementan la resolución alcanzada en el seguimiento de reacciones. Con ello es posible identificar fácilmente los productos involucrados en los procesos bajo estudio.^{134,135}

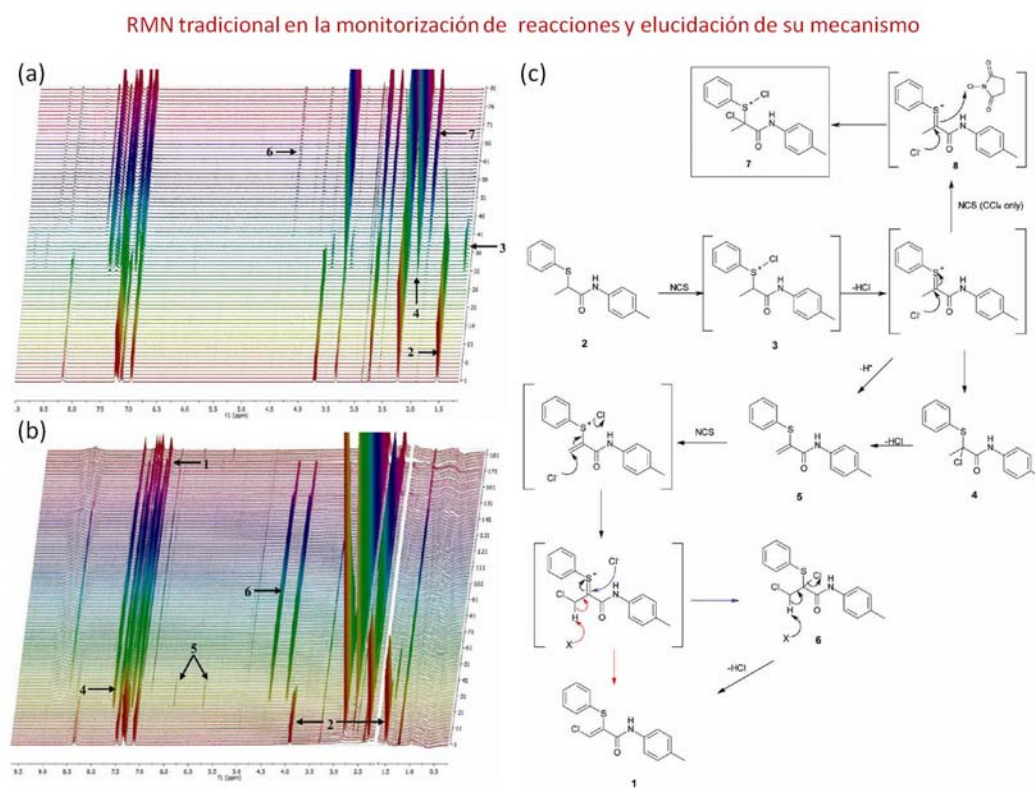


Figura II.43. Espectros ^1H -RMN del seguimiento de la reacción de conversión en cadena de la α -tioamida en α -tio- β -cloroacrilamida, mediado por *N*-clorosuccinimida (NCS) (a) en tetracloruro de carbono, (b) en acetonitrilo. En ellos se observan las diferentes especies que intervienen en el proceso, (c) mecanismo revisado.

¹³³ Foley, D.A.; Doecke, C.W.; Buser, J.Y.; Merritt, J.M.; Murphy, L.; Kissane, M.; Collins, S.G.; Maguire, A.R.; Kaerner, A. *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 9630-9640.

¹³⁴ Kentgens, A.P.M.; et. al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 5014-5015.

¹³⁵ Gomez, M.V.; Verputten, H.H.J.; Díaz-Ortíz, A.; Moreno, A.; de la Hoz, A.; Valders, A.H. *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 4514-4516.

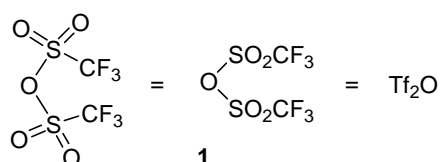
II.6 Reacción de compuestos carbonílicos con reactivos electrófilos en presencia de nucleófilos.

La reacción de formación de diferentes pirimidinas a partir de cetonas y nitrilos en presencia de anhídrido trifílico, es una de las reacciones que más se ha estudiado durante el desarrollo de esta Tesis, aplicando la espectroscopía de UF-NMR, con objeto de monitorizar estos procesos en tiempo real. Como se verá en los capítulos posteriores, se ha podido obtener información importante en aspectos tanto mecanísticos, como cinéticos.

Esta química ha venido siendo desarrollada ampliamente a lo largo de muchos años en nuestro grupo de trabajo, tal y como se muestra en los siguientes apartados.

II.6.1 Reacción de compuestos carbonílicos con reactivos electrófilos.

Cuando un sistema insaturado se hace reaccionar con un reactivo electrófilo, se produce una interacción que da lugar a un intermedio catiónico. Entre los numerosos reactivos electrófilos existentes, como puedan ser los ácidos próticos y los de Lewis, uno de los más empleados es el anhídrido trifluorometanosulfónico (Tf_2O) **1**.¹³⁶



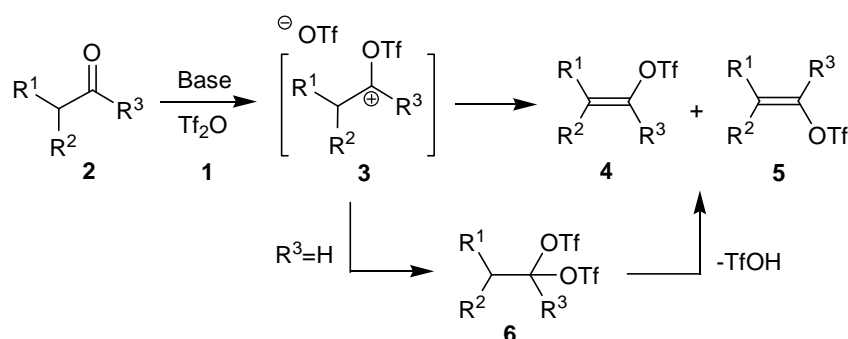
Esquema 1

La reacción directa entre este poderoso electrófilo con compuestos carbonílicos como las cetonas **2**, es un proceso muy conocido en Química Orgánica, debido a

¹³⁶ Para una revisión de las transformaciones químicas inducidas por el anhídrido trifílico véase: (a) Baraznenok, I.L.; Nenajdenko, V.G.; Balenkova, E.S. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 3077-3119. (b) Chassaing, S.; Specklin, S.; Weibel, J.M.; Pale, P. *Tetrahedron*, **2012**, 68, 7245-7273. (c) Martínez-Álvarez, R.; Herrera, A. The reaction of carbonyl compounds and nitriles with triflic anhydride. En *Targets in Heterocyclic Systems*, Attanasi, O.A.; Spinelli, D., Eds., Sociedad Italiana de Química: Urbino-Italia, 2008, 59-84.

sus numerosas aplicaciones sintéticas.¹³⁷ Dependiendo de la naturaleza del compuesto carbonílico, esta reacción puede conducir a diferentes productos.

La reacción de cetonas enolizables **2** con Tf_2O conduce a la formación de triflatos vinílicos (ésteres vinilsulfónicos) **4** y **5**.¹³⁸ Sin embargo, cuando se lleva a cabo la reacción con cetonas difícilmente enolizables, se obtienen como productos finales los bistriflatos geminales **6** y/o los triflatos transpuestos (Esquema 2). En el caso de los aldehídos, se pueden aislar tanto ésteres vinilsulfónicos como gem-bistriflatos, dependiendo de las condiciones en que se realice la reacción.¹³⁹



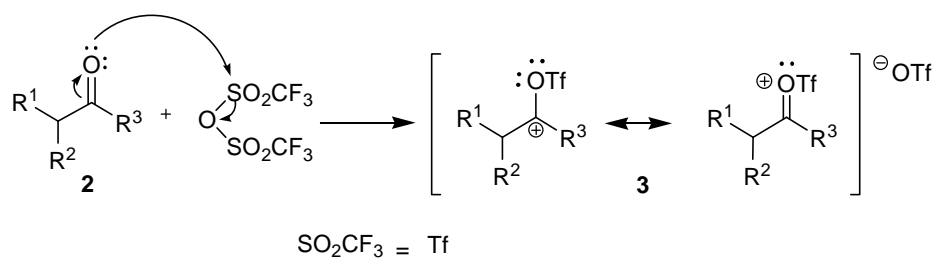
Esquema 2

El mecanismo general propuesto para todas estas reacciones parece implicar un ataque electrófilo del átomo de azufre del anhídrido trifílico al oxígeno del grupo carbonilo, lo cual conduce a la formación de un catión trifiloxicarbenio como intermediario, actuando el anión triflato como contraión (Esquema 3).

¹³⁷ (a) Charette, A.B.; Mathieu, S.; Martel, J. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 5401-5404. (b) Shackelford, S.; et al. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 267-275.

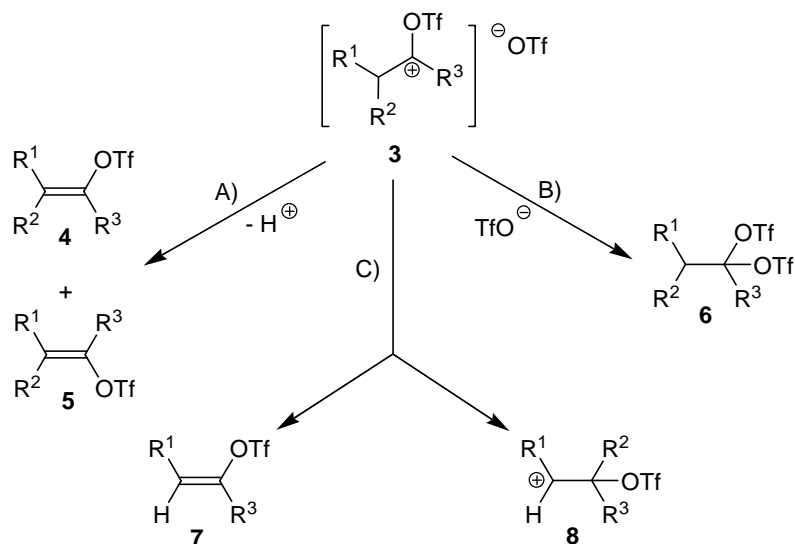
¹³⁸ (a) Stang, P.J.; Hanack, M.; Subramanian, L.R. *Synthesis*, **1982**, 85-126. (b) Ritter, K.; *Synthesis*, **1993**, 735-762. (c) Dueber, E.; Stang, P.J.; Pfeiffer, W.D.; Summerville, R.M.; Imhoff, M.A.; Scheleyer, P.V.R.; Hummel, K.; Bücher, S.; Harding, C.E.; Hanack M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1970**, 9, 521-522.

¹³⁹ (a) Wright, M.E.; Pulley, S.R. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 2886-2889. (b) García Martínez, A.; Martínez Álvarez, R.; García Fraile, A.; Subramanian, L.R.; Hanack, M. *Synthesis*, **1987**, 49-51. (c) Moreno Jiménez, F. *Nuevas Metodologías en la ciclación en síntesis de pirimidinas*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 1994.



Esquema 3

El catión trifilioxicarbenio **3** resultante puede evolucionar de diferentes maneras, dependiendo de su estructura y de las condiciones de reacción, como queda reflejado en el Esquema 4.



Esquema 4

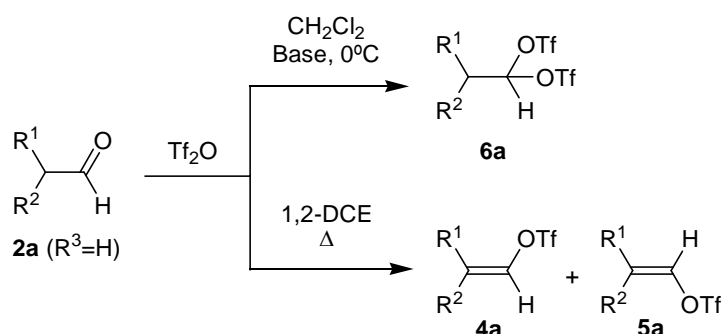
A. Eliminación de un protón en α:

La eliminación de un protón en posición α respecto al grupo carbonilo da lugar a la formación de los triflatos vinílicos **4** y **5**.¹⁴⁰ Este proceso es predominante para sustratos de cadena abierta o monocíclicos que posean hidrógenos en dicha posición α.

¹⁴⁰ Stang, P.J.; Hanack, M.; Subramanian, L.R. *Synthesis*, **1982**, 85-126.

B. Ataque nucleófilo del anión triflato:

El catión trifililoxicarbenio puede sufrir el ataque del anión triflato, lo que conduce a la obtención de bistriflato geminales **6**.¹⁴¹ La existencia de este catión intermedio ha podido ser demostrada en la reacción de aldehídos con Tf_2O .¹⁴² Como se muestra en el Esquema 5, cuando la reacción transcurre entre 0 y 25 °C, en diclorometano, se produce la captura nucleófila del catión por parte del anión triflato, conduciendo a gem-bistriflato **6a**. En cambio, si la reacción se lleva a cabo a reflujo de 1,2-dicloroetano se obtienen los triflato de vinilo **4a** y **5a**, debido a la eliminación del protón en α .



Esquema 5

C. Ruptura de enlace C-C:

La ruptura del enlace C-C puede ser fragmentativa, lo que originaría el triflato **7**,¹⁴³ o bien transpositiva, lo cual conduciría al carbocatión **8**.¹⁴⁴ Tanto una ruptura como la otra provocan la formación de productos con un esqueleto hidrocarbonado distinto del original.

II.6.2. Captura de las especies generadas mediante nucleófilos presentes en el medio de reacción.

Cuando los compuestos insaturados, como puedan ser las olefinas o los compuestos carbonílicos, reaccionan con reactivos electrófilos, se producen

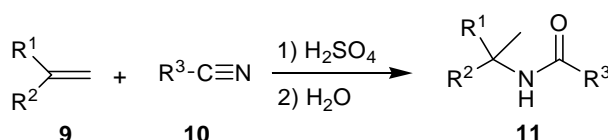
¹⁴¹ García Martínez, A.; Espada Ríos, I.; Teso Vilar, E. *Synthesis*, **1979**, 382-383.

¹⁴² García Martínez, A.; Martínez-Álvarez, R.; García Fraile, A.; Subramanian, L.R.; Hanack, M. *Synthesis*, **1987**, 49-51.

¹⁴³ García Martínez, A.; García Fraile, A.; Herrera, A.; Sánchez-García, J.M. *An. Quim.*, **1979**, 75, 723-725.

¹⁴⁴ a) García Martínez, A.; Martínez-Álvarez, R.; Teso Vilar, E. *An. Quim.*, **1981**, 77, 196-199. b) Kraus, W.; Zartner, G. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 18, 13-16. c) Bentz, H.; Subramanian, L.R.; Hanack, M.; García Martínez, A.; Gómez Marín, M.; Pérez-Ossorio, R. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 18, 9-12.

carbocationes. Si esta reacción se lleva a cabo en presencia de reactivos nucleófilos, se podrá producir la captura del intermedio catiónico formado. En base a estos principios, Ritter en 1948 sintetizó amidas *N*-sustituidas **11** a partir de alquenos **9**, por tratamiento con nitrilos **10** en un medio de ácido sulfúrico concentrado,^{145,146} como se recoge en el Esquema 6.



Esquema 6

En su forma general, la reacción de Ritter consiste en la captura de un ión carbenio por parte de un nitrilo y da lugar a la formación de amidas. En un principio, se emplearon alquenos y alcoholes en medio ácido concentrado como fuente de carbocationes (Esquema 6). Posteriormente, la reacción de Ritter se fue extendiendo a otros compuestos que fueran capaces de generar un ión carbenio, como son, entre otros, los aldehídos y las cetonas. Para llevar a cabo esta reacción se pueden emplear distintos ácidos: el sulfúrico, perclórico, fosfórico, fórmico o el trifluoruro de boro. En estas condiciones, los aldehídos reaccionan con nitrilos en presencia de ácido para dar lugar a diamidas geminales,¹⁴⁷ mientras que la reacción de cetonas con nitrilos en presencia de ácido sulfúrico origina la formación de β -acilaminocetonas.¹⁴⁸

Zielinski extendió la reacción de Ritter, describiendo la síntesis de pirimidinas **14** mediante la reacción de cetonas y nitrilos en presencia de oxiclورو de fósforo¹⁴⁹ (Esquema 7), con un rendimiento bajo en la mayoría de los casos. Además, en el proceso también se obtienen piridinas **15** como productos secundarios.

¹⁴⁵ Ritter, J.J.; Minineri, P.P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 4045-4048.

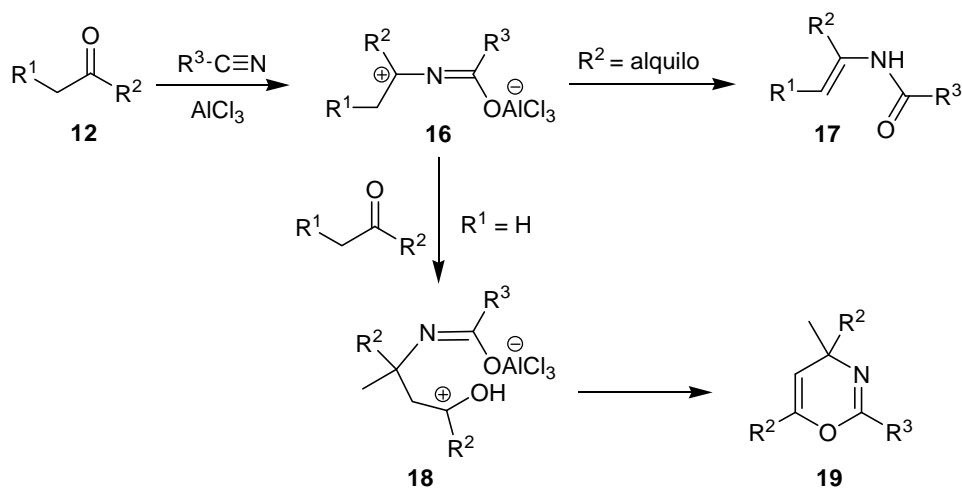
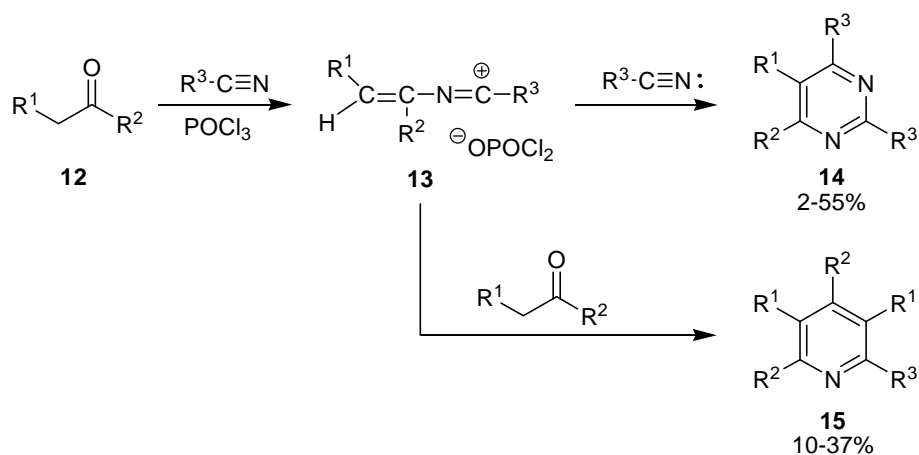
¹⁴⁶ Para una revisión actualizada de la reacción de Ritter ver: Guérinot, A.; Reymond, S.; Cossy, J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 19-28.

¹⁴⁷ Magat, E.E.; Faris, B. F.; Reith, J.E.; Salisbury, L.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 1028-1031.

¹⁴⁸ Khorlin, A.Y.; Chizov, O.S.; Kochetkov, N.K. *Zh. Obshch. Khim.*, **1959**, 29, 3411. *Chem. Abstr.*, **1960**, 54, 16418h.

¹⁴⁹ Zielinski, W. *Heterocycles*, **1985**, 23, 1639-1644.

Sin embargo, con otro ácido de Lewis, como es el tricloruro de aluminio, se produce una reacción de Ritter que no conduce a pirimidinas sino a 4*H*-1,3-oxazinas **19**¹⁵⁰ tal como se observa en el Esquema 8.



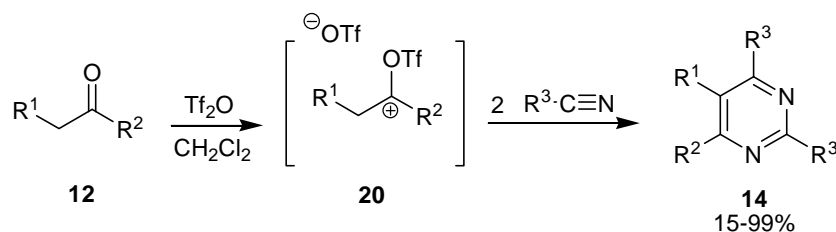
¹⁵⁰ Auricchio, S.; Vajna de Pava, O.; Vera, E. *Synthesis*, **1979**, 116-117.

II.6.2.1 Síntesis de pirimidinas a partir de cetonas y nitrilos

Al incrementar la fortaleza del reactivo electrófilo, mejora apreciablemente tanto la selectividad, como el rendimiento de los productos que se forman. Así, en este contexto, la reacción de cetonas enolizables con anhídrido trifluorometanosulfónico en presencia de nitrilos alifáticos o aromáticos, conduce exclusivamente a la obtención de pirimidinas como productos de captura nucleófila (Esquema 9). Se trata de un proceso muy sencillo, que conduce a la formación de alquil y arilpirimidinas con buenos rendimientos, lo que confiere utilidad sintética a esta reacción.¹⁵¹

Se ha estudiado la reacción con cetonas alifáticas y alicíclicas, simétricas y no simétricas. Tanto la estructura como los rendimientos de los productos obtenidos indican que la reacción es altamente regioselectiva, dependiendo de las características de los residuos unidos al grupo carbonilo.¹⁵²

Dentro de las aplicaciones que presentan estos compuestos, se puede destacar el empleo de las alquilpirimidinas como saborizantes o la utilización de las tri(*terc*-butil)pirimidinas como bases no nucleófilas.^{153,154}



Esquema 9

¹⁵¹ (a) García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Moreno Jiménez, F.; García Fraile, A.; Subramanian, L.R.; Hanak, M. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 1627-1630. (b) García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Martínez Álvarez, R.; Teso Vilar, E.; García Fraile, A.; Osío Barcina, J.; Parada Iglesias, L. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 1929-1932.

¹⁵² Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Chioua, M.; Chioua, R.; Sánchez, A. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 10053-10058.

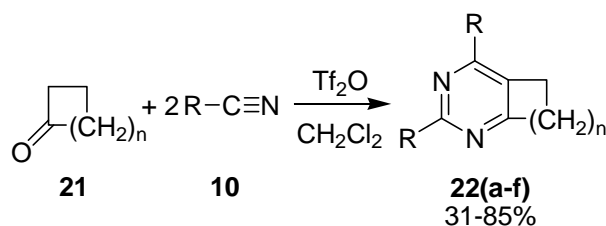
¹⁵³ Herrera-Fernández, A.; Martínez-Álvarez, R.; Chioua, M.; Chioua, R.; Almy, J.; Loaiza, O.A. *Arkivoc*, **2007**, xvi, 58-64.

¹⁵⁴ (a) Crich, D.; Smith, M.; Yao, Q.; Picione, J. *Synthesis*, **2001**, 323-326. (b) García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Martínez Álvarez, R.; Silva Losada, M.C.; Molero Vilchez, D.; Subramanian, L.R.; Hanack, M. *Synthesis*, **1990**, 881-882.

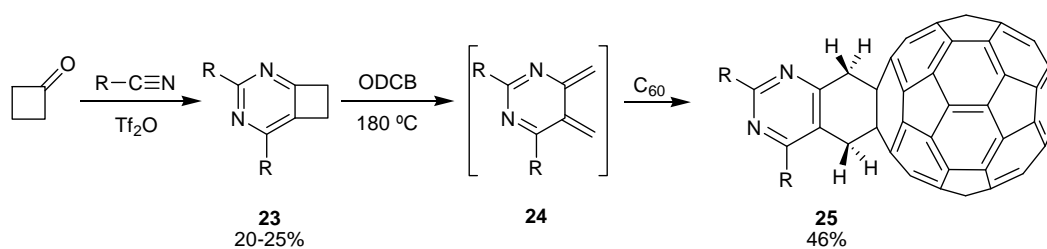
La importancia de esta metodología sintética se ha puesto de manifiesto por la aplicación de esta síntesis en la obtención de otros sistemas que se resumen a continuación:

Pirimidinas bicíclicas:

La síntesis de alquil y arilpirimidinas expuesta anteriormente es asimismo aplicable a la obtención de cicloalquil[d]pirimidinas **22**, a través de la reacción con cetonas cíclicas **21**.



De esta forma se pueden obtener pirimidinas bicíclicas con rendimientos de moderados a buenos. Especialmente interesante es la síntesis de la ciclobuta[d]pirimidina **21**, pues aunque se obtiene en bajo rendimiento a partir de la ciclobutanona, se trata de un excelente precursor de *orto*-quinodimetanos pirimidínicos mediante la apertura térmica del anillo de 4 eslabones.¹⁵⁵ Estos sustratos son excelentes dienos con los que se consigue la incorporación vía reacción Diels-Alder del anillo de pirimidina a un filodieno especial como es el C₆₀ tal como se observa en el Esquema 11. Las pirimidinas así sintetizadas son compuestos de particular interés en la búsqueda de nuevas propiedades.¹⁵⁶

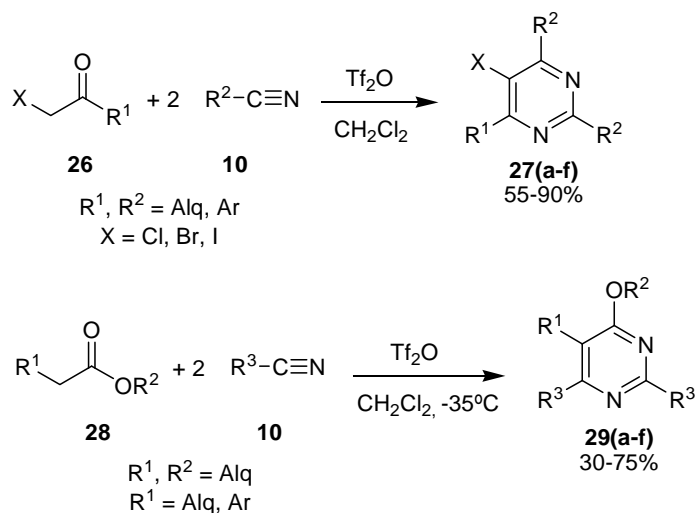


¹⁵⁵ Herrera, A.; Martínez, R.; González, B.; Illescas, B.; Martín, N.; Seoane, C. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 4873-4876.

¹⁵⁶ González, B.; Herrera, A.; Illescas, B.; Martín, N.; Martínez, R.; Moreno, F.; Sánchez, L.; Sánchez, A. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 6807-6813.

Halo y alcoxipirimidinas:

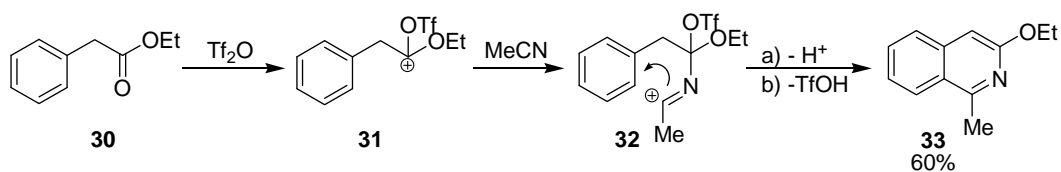
Empleando α -haloacetonas o ésteres alifáticos como sustratos de partida, es posible realizar la monofuncionalización de las pirimidinas, obteniendo respectivamente 4-halopiridininas y 4-alcoxipirimidinas (Esquema 12).¹⁵⁷



Esquema 12

Isoquinolinas:

A diferencia de los resultados obtenidos con ésteres alifáticos, cuando se emplean derivados del ácido fenilacético **30**, se produce la ciclación intramolecular en la que interviene una molécula exclusiva de nitrilo nucleófilo, conduciendo a derivados de isoquinolina **33** con buenos rendimientos, tal como se observa en el Esquema 13.¹⁵⁸



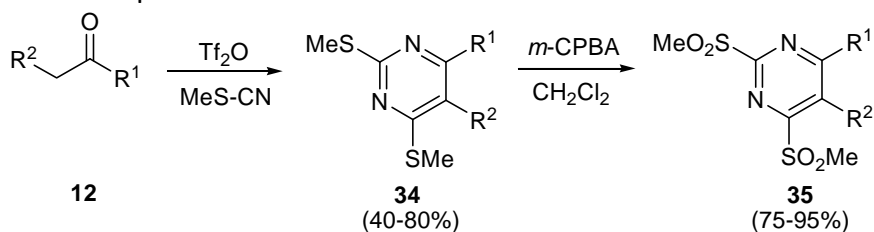
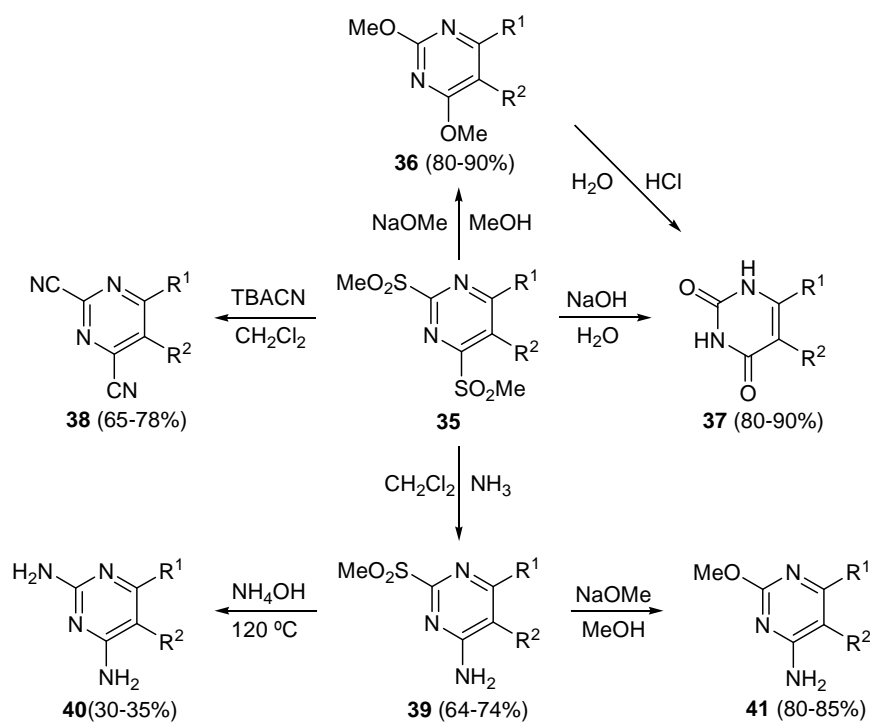
Esquema 13

¹⁵⁷ (a) García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Molero Vélchez, D.; Hanack, M.; Subramanian, L.R. *Synthesis*, **1992**, 1053-1054. (b) García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Martínez-Álvarez, R.; Molero Vélchez, D.; Laorden Gutierrez, M.; Subramanian, L.R. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 4825-4830.

¹⁵⁸ García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Molero Vélchez, D.; Laorden Gutierrez, M.; Subramanian, L.R. *Synlett*, **1993**, 229-230.

Pirimidinas bifuncionalizadas:

El empleo de alquiltionitrilos como nucleófilos da lugar a la doble introducción de la función tioalquilo, formando la 2,4-bis(metiltio)pirimidina **34**. La oxidación da lugar con facilidad a derivados bisalquilsulfonilo **35** (Esquema 14), cuyas excelentes características como grupo saliente permiten su sustitución, con lo que se puede acceder a diferentes pirimidinas mono y disustituidas,¹⁵⁹ como se muestra en el Esquema 15.

**Esquema 14****Esquema 15**

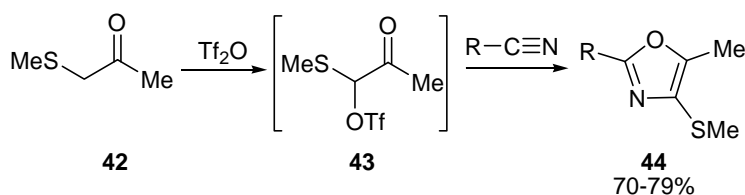
¹⁵⁹ García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Moreno Jimenez, F.; Luengo Fraile, M.; Subramanian, L.R. *Synlett*, **1994**, 559-560.

De la reacción con ésteres alifáticos, en presencia de tiocianato de metilo y Tf_2O se obtienen principalmente 4-alcoxy-2,6-bis(metiltio)pirimidinas y una cantidad variable de tiocarbamatos como producto secundario.¹⁶⁰

Síntesis de 1,3-oxazoles:

Particularmente interesante resulta la reacción de la 1-(metiltio)cetona **42** con diferentes nitrilos en presencia de Tf_2O , pues no conduce a la formación de metiltiopirimidinas como es de esperar. En su lugar se obtienen 5-metil-4-tiometil-1,3-oxazoles **44** sustituidos en posición 2, con buenos rendimientos (Esquema 16).

El mecanismo propuesto para esta reacción involucra la presencia del triflato 1-(metiltio)-2-oxopropilo **43**, el cual no ha podido ser aislado debido a su inestabilidad, pero que sin embargo ha sido detectado mediante espectroscopía de RMN, a baja temperatura.¹⁶¹



A modo de resumen general, en la Figura II.44 se recogen algunas de las diferentes aplicaciones sintéticas de la reacción de compuestos carbonílicos con nitrilos en presencia de Tf_2O . Se trata de reacciones sencillas que permiten la obtención de compuestos heterocíclicos como benzotiacinas, oxazoles o pirimidinas en un solo paso, con altos rendimientos.

Con el fin de explicar la naturaleza de los productos formados, en nuestro grupo se han estudiado estas reacciones y sus mecanismos durante muchos años, a lo largo de los cuales se han postulado la existencia de diferentes especies catiónicas y rutas mecanísticas. Se comentará seguidamente en detalle para la obtención de pirimidinas.

¹⁶⁰ Herrera Fernández, A.; Martínez-Álvarez, R.; Ramiro, P.; Almy, J.; Molero, D.; Sánchez, A. *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 3332-3337.

¹⁶¹ Herrera Fernández, A.; Martínez-Álvarez, R.; Ramiro, P.; Molero, D.; Almy, J. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 3026-3032.

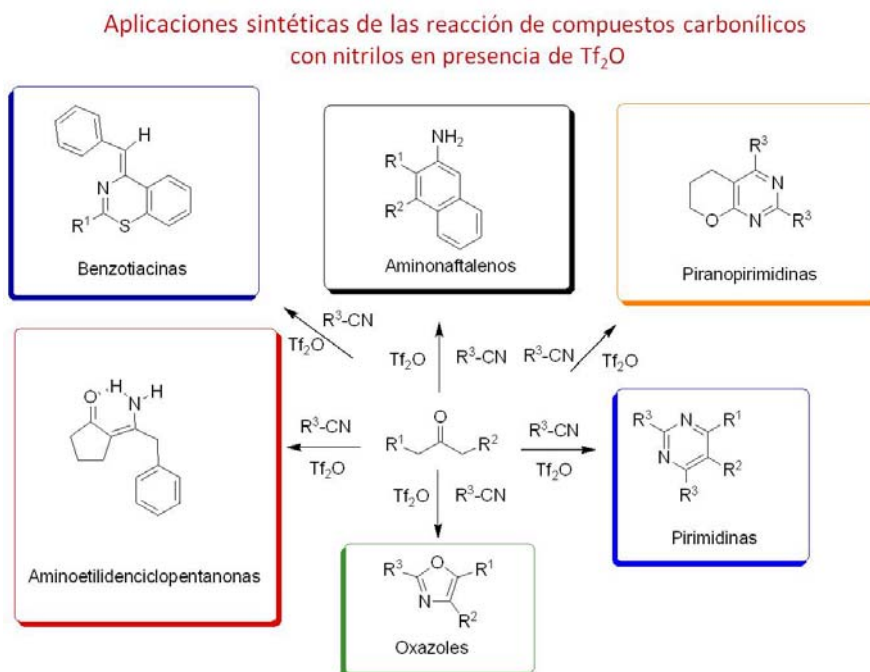


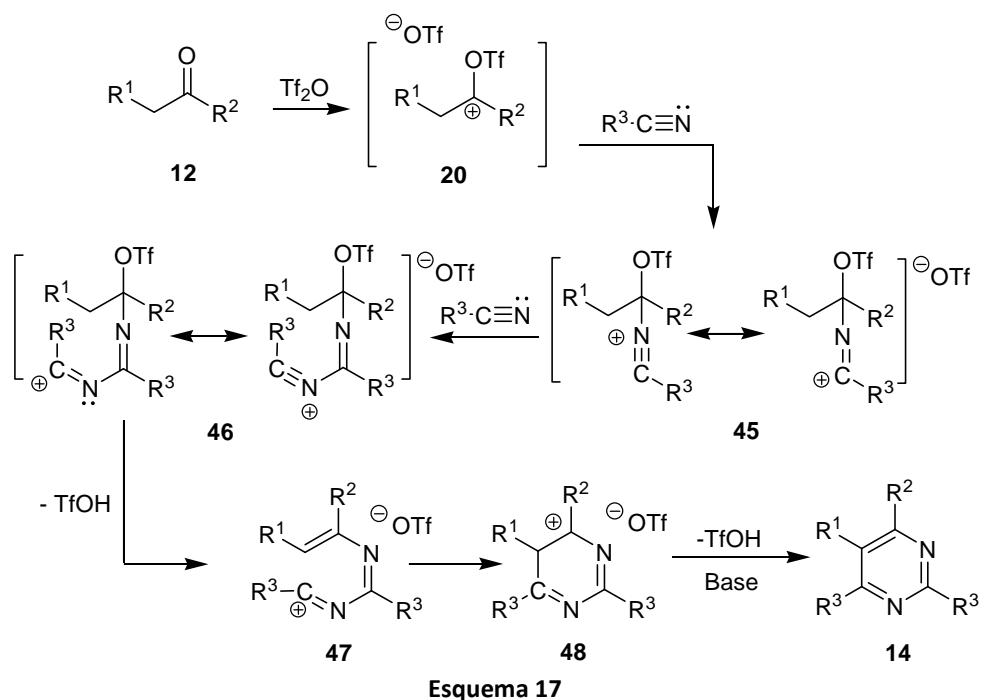
Figura II.44. La reacción de cetonas en presencia de diferentes nitrilos y Tf_2O , conduce a la formación de diferentes sistemas heterocíclicos con excelentes rendimientos.

II.6.3. Propuesta mecanística de la síntesis de pirimidinas a partir de cetonas y nitrilos en presencia de Tf_2O

El mecanismo aceptado para la reacción de formación de pirimidinas a partir de cetonas y nitrilos, recoge los datos obtenidos de las reacciones de compuestos carbonílicos con reactivos electrófilos y pretende explicar la captura y evolución de las especies catiónicas formadas a lo largo del proceso. Este mecanismo se muestra en el Esquema 17.

La reacción comienza con la formación de un catión trifliloxicarbenio **20**, como resultado del ataque electrófilo del anhídrido triflico sobre el grupo carbonilo de la cetona **12**. Dicho catión es atrapado nucleófilamente por una molécula de nitrilo, dando lugar así al catión imonio-nitrilio **45**, estabilizado por resonancia. Éste sufre a su vez el ataque nucleófilo de una segunda molécula de nitrilo, originando el catión **46**, también estabilizado por resonancia. La eliminación de

TfOH produce la necesaria formación de un doble enlace en el intermedio catiónico **47**. Este doble enlace será atacado electrófilamente para dar lugar al intermedio **48**. La pérdida final de TfOH da lugar a la correspondiente pirimidina **14**.



Los cationes imonio **45** y **46** también se han postulado como intermedios en la condensación de nitrilos y amidas activadas por la acción de la 2-cloropiridina y Tf₂O para dar lugar a pirimidinas.¹⁶²

En esta memoria se pretende aplicar la técnica de UF-NMR para el estudio mecanístico de diferentes sistemas dinámicos, como pueda ser la reacción de síntesis de pirimidinas, desarrollada en nuestro grupo de investigación. Con ello se pretende conseguir información espectroscópica que permita la determinación estructural de especies intermedias involucradas y la obtención de datos cinéticos de los procesos.

¹⁶² Movassaghi, M.; Hill, M.D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14254-14255.

II.7 Utilización de programas de modelización molecular en el estudio de mecanismos de reacción

En el presente trabajo, se han realizado las estimaciones de los desplazamientos químicos de diferentes estructuras de productos iniciales y finales, así como de diversos intermedios de reacción implicados en las reacciones estudiadas, empleando un software comercial para llevar a cabo la modelización molecular del sistema.

La modelización molecular puede definirse como el conjunto de técnicas informáticas basado en los métodos de la química teórica y en los datos experimentales, que puede ser usado para analizar las moléculas o sistemas moleculares y/o para predecir las propiedades moleculares y biológicas. Constituye la base de la denominada *química seca*, que se refiere al modelado de todos los aspectos de la química mediante cálculos computacionales, complementando e incluso sustituyendo a la experimentación.

La química computacional estudia la caracterización y predicción de la estructura y estabilidad de los sistemas químicos, calculando diferencias de energía entre varios estados para explicar propiedades espectroscópicas y mecanismos de reacción a nivel atómico. Los principales tipos de métodos usados en los cálculos son: *mecánica molecular* y *mecánica cuántica*.

La *mecánica molecular* se basa en la aplicación de las leyes de la mecánica clásica, considerando a las moléculas como conjuntos de esferas (átomos), con masa, radio, volumen, unidos por muelles (enlaces) con una constante de fuerza asimilable a la fuerza del enlace. La teoría considera implícitamente a los electrones y los estados energéticos se originan como consecuencia de las interacciones entre los núcleos. La hipótesis de partida considera que los enlaces poseen longitudes y ángulos naturales o de equilibrio a los que las moléculas se ajustan. Una desviación de estos valores implica un aumento de energía del sistema. Se considera que los núcleos están sometidos a un *campo de fuerzas*, que se compone de la suma de una serie de términos energéticos que modelizan las tensiones de sus enlaces, de sus ángulos, sus torsiones, interacciones de v. d. W. y los enlaces de hidrógeno. Como consecuencia, se puede calcular la *energía potencial* de un sistema determinado. Existen diferentes campos de fuerza que pueden ser aplicados (MM+, AMBER, BIO+, OPLS). El resultado de los cálculos de mecánica molecular permite determinar la geometría molecular, la energía

conformacional, barrera torsional, energía de interacción molecular, frecuencias vibracionales, calor de formación y otras magnitudes termodinámicas. Son cálculos que se pueden aplicar a sistemas de tamaño apreciable y se obtienen con rapidez pues no requieren elevados recursos del sistema informático. Las limitaciones vienen dadas por el hecho de que cada campo de fuerzas solamente obtiene resultados para un número reducido de moléculas. Por otro lado, al no considerar los electrones, no son adecuados para el tratamiento de problemas en donde los efectos electrónicos predominan, como son los concernientes a la ruptura y formación de enlaces.

Los métodos de *mecánica cuántica* utilizan las leyes de la mecánica cuántica e incluyen *métodos semi-empíricos* y *métodos ab initio* como base para el cálculo computacional. Tratan las moléculas como conjuntos de átomos, con su dotación electrónica concreta, hibridación, orbitales, etc. Consideran explícitamente la dotación electrónica y los diferentes estados energéticos surgen como consecuencia de las interacciones entre los orbitales. Describen tanto los enlaces que se forman como los que se rompen y a diferencia de la mecánica molecular, necesitan de apreciables recursos del sistema informático. Por ello, se aplican fundamentalmente en el estudio de sistemas pequeños. En los métodos basados en la mecánica cuántica, las moléculas o los estados vienen definidos por funciones de onda. Una vez que se ha elegido el tipo de función de onda que representa al sistema, a partir de la ecuación de Schrödinger, se realiza el cálculo de la energía esperada del sistema y se pueden obtener datos de otras propiedades del mismo.

Los *métodos semi-empíricos*, tales como AM1, MINDO/3 y PM3, están implementados en programas de uso habitual como MOPAC, AMPAC, HyperChem o Gaussian y emplean parámetros derivados de datos experimentales conocidos, que simplifican el cálculo computacional. Con ellos se resuelve una forma aproximada de la ecuación de Schrödinger que depende de los parámetros adecuados al tipo de sistema químico que se esté estudiando. Diferentes métodos *semi-empíricos*, utilizan pues distintos conjuntos de parámetros de cálculo.

Los *métodos ab initio*, a diferencia de los métodos anteriores, no emplean parámetros experimentales en sus cálculos computacionales. En su lugar, estos cálculos se basan exclusivamente en las leyes de la mecánica cuántica y en los

valores de un número reducido de constantes físicas como la velocidad de la luz, masa y carga nuclear y electrónica o constante de Planck. Los métodos *ab initio* proporcionan soluciones a la ecuación de Schrödinger empleando una serie de aproximaciones matemáticas rigurosas. El programa *Gaussian* contempla el conjunto completo de métodos para el estudio de la estructura electrónica.

Los *métodos semi-empíricos* y *ab initio* se diferencian en el balance coste computacional frente a la aproximación del resultado. Los *métodos semi-empíricos* son poco costosos y proporcionan descripciones cualitativas razonables de los sistemas moleculares, así como predicciones aproximadas de energías y estructuras en aquellos sistemas para los que exista un conjunto de parámetros adecuado. Por el contrario, los cálculos *ab initio* proporcionan hoy en día predicciones cuantitativas de gran calidad para un gran número de sistemas, con pocas limitaciones en cuanto a su tamaño, aunque el tiempo de análisis depende de éste y de las características del sistema informático empleado para el cálculo.

A los métodos *ab initio*, se ha unido recientemente una tercera clase de métodos para la estructura electrónica similares a ellos, que son los *métodos del funcional de la densidad* (DFT). Poseen requerimientos de cálculo análogos. En su formulación original, la teoría DFT supone que la energía de un sistema se puede expresar de manera exacta como un funcional de la densidad electrónica. Desgraciadamente este funcional no se conoce, por lo que el objetivo a conseguir es obtener una buena aproximación de este funcional que se aplicará posteriormente sobre la densidad electrónica. En principio, como la energía puede extraerse de la densidad electrónica, no es necesario introducir la aproximación orbital molecular en la metodología DFT. En la metodología DFT más exitosa introducida por Kohn y Sham,¹⁶³ la densidad electrónica se expresa como un sumatorio sobre los orbitales moleculares ocupados.

La elección del funcional para el intercambio-correlación es el punto clave en un cálculo DFT. Básicamente existen dos grandes familias de funcionales para el cálculo de la energía de intercambio-correlación: los basados en la Aproximación Local de la Densidad (LDA) y aquellos que incluyen correcciones de gradiente, como los métodos GGA (Generalized Gradient Approximation). El primer grupo tiene en cuenta sólo el valor de la densidad electrónica en cada punto del

¹⁶³ Kohn, W.; Sham, L. J. *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133-A1138.

espacio, mientras que el segundo también tiene en cuenta variaciones en el gradiente de la densidad. Los funcionales GGA, en general, describen mejor el intercambio-correlación que los LDA.

Los desplazamientos químicos teóricos de ^1H -RMN se han calculado empleando el programa ACD/Labs (Release 8.00). El programa emplea para ello una extensa base de datos, sobre los que las predicciones se establecen mediante parámetros de correcciones estructurales específicas.

En el trabajo que se presenta, los cálculos acerca de los desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN han sido realizados con el conjunto de programas Gaussian 09¹⁶⁴ utilizando la aproximación GIAO,¹⁶⁵ el funcional metahíbrido M06-2X¹⁶⁶ y las funciones de base de calidad doble-zeta 6-31+G*. Los efectos del disolvente (acetronitrilo) se han modelado utilizando el método PCM (Polarizable Continuum Model).¹⁶⁷ Este método se denota como GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G* a lo largo de este trabajo.

La discusión acerca del procedimiento de cálculo empleado excede del ámbito de esta Tesis. Los cálculos que se presentan han sido realizados por Ángel Sánchez Vázquez bajo el asesoramiento del Prof. Israel Fernández López.

¹⁶⁴ Frisch, M. J. et al. Gaussian 09, revision B.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.

¹⁶⁵ Wolinski, K.; Hinton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 8251-8260.

¹⁶⁶ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 157-167.

¹⁶⁷ (a) Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *Chem. Phys.*, **1981**, *55*, 117-129. (b) Pascual-Ahuir, J. L.; Silla, E.; Tuñón, I. *J. Comput. Chem.*, **1994**, *15*, 1127-1138. (c) Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A.*, **1998**, *102*, 1995-2001.

III. Objetivos

Objetivos

La aparición de la RMN ultrarrápida ha permitido reducciones muy importantes en el tiempo de adquisición de los experimentos multidimensionales. Ello ha abierto nuevas perspectivas de utilización para esta prometedora técnica. Sin embargo, la realización práctica de los experimentos ultrarrápidos exige la búsqueda y mejora de una serie de aspectos experimentales, tanto desde el punto de vista de la RMN como de la naturaleza química de los sistemas a estudiar.

El objetivo principal de esta Tesis consiste en la aplicación de la técnica de RMN ultrarrápida al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real como lo son las reacciones orgánicas y para ello es necesario la optimización y realización de estos experimentos, lo cual se ha llevado a cabo en los espectrómetros del CAI de RMN y RSE de la UCM.

Para esto, se abordará el estudio de diferentes reacciones orgánicas. Algunas de ellas se centran en la química de formación de pirimidinas y otros heterociclos, desarrollada por nuestro grupo de investigación. Se aplicarán secuencias de pulsos de UF-NMR dinámicas, de correlación homonuclear, heteronuclear y combinadas. De los resultados de las observaciones en tiempo real, han de extraerse importantes conclusiones acerca de los mecanismos de reacción implicados y obtener datos cinéticos. Con todo ello se evaluarán las características de aplicación de las diferentes técnicas ultrarrápidas, lo que ha de proporcionar unas pautas experimentales que acerquen la aplicación de estas técnicas de RMN al estudio de reacciones y sistemas reales.

IV. Resultados y discusión

Capítulo 1: Algunos problemas prácticos en la realización experimentos de UF-NMR

En el primer capítulo de este apartado IV se pretende acercar al potencial usuario de la metodología ultrarrápida a algunos problemas prácticos que se derivan de las características de estos experimentos. La menor sensibilidad de los mismos, junto con el necesario dominio de los gradientes para su realización adecuada, ha llevado a comenzar este capítulo 1 con dos aspectos de vital importancia.

1.1. Límites de detección

La UF-NMR es una metodología que como se ha visto hasta ahora, puede ser aplicada en la obtención de una variedad de espectros de RMN nD tanto homo como heteronucleares. Esto, unido a que permite obtener valiosa información en cortos periodos de tiempo, significa un avance importante para el estudio de una serie creciente de sistemas dinámicos químicos y biológicos.

Sin embargo, como se ha comentado en los antecedentes de esta memoria (apartado II.3.3), la técnica UF-NMR ha demostrado ser menos sensible^{168,169} comparada con la RMN clásica debido a la necesidad de muestrear rápidamente varias dimensiones en un solo *scan*. Esto a su vez, hace que se requiera aumentar el ancho de banda del receptor del equipo de RMN, produciendo como consecuencia un aumento en el ruido detectado.

Por otro lado, en la RMN la sensibilidad depende del núcleo estudiado. Ello es función de sus características nucleares (μ y γ) y de su abundancia natural, siendo este último un valor crítico.

Tal como indica la Tabla 1.1, núcleos como el ^{13}C y el ^{15}N poseen características desfavorables para su observación en condiciones de abundancia natural, razón por la que el estudio de estos núcleos se vio seriamente obstaculizado durante los comienzos de la RMN, hasta la introducción de la técnica de la transformada de Fourier. Así, el núcleo de ^{13}C , especialmente importante en la química orgánica, es 5800 veces menos sensible que el núcleo de ^1H en los experimentos de RMN.¹⁷⁰

¹⁶⁸ Frydman, L. *C.R.Chimie.*, **2006**, 9, 336-345.

¹⁶⁹ Giraudeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.*, **2008**, 192, 151-158.

¹⁷⁰ Günther, H. *NMR Spectroscopy: basic principles, concepts, and applications in chemistry*, 3^a ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Alemania, 2013.

La puesta en marcha de secuencias de UF-NMR requiere ineludiblemente disponer de suficiente sensibilidad para que mediante este método se puedan obtener los resultados que se esperan. Surge por tanto, la necesidad de cuantificar cuales son los límites de detección para cada una de las secuencias ultrarrápidas desarrolladas en nuestro grupo y empleadas en el trabajo que recoge esta memoria.

Tabla 1.1. Propiedades nucleares de algunos núcleos de importancia en la espectroscopía de RMN de compuestos orgánicos.

Núcleo	Momento magnético (μ)	Cte. giromagnética γ ($10^8 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Sensibilidad relativa	Abundancia natural (%)
^1H	2.79277	2.675	1.000	99.98
^{13}C	0.70216	0.673	0.016	1.108
^{15}N	0.40369	0.193	0.001	0.365
^{31}P	1.1316	1.083	0.066	100.0

1.1.1. Límites de detección para las secuencias de acoplamiento escalar homonuclear 2D UF-COSY y 2D UF-TOCSY

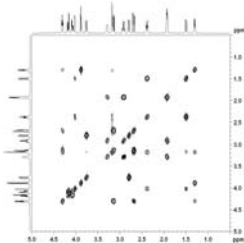
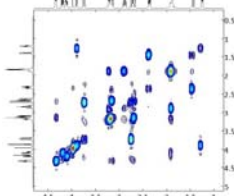
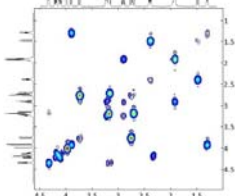
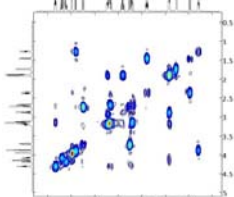
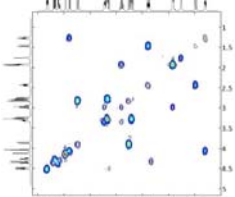
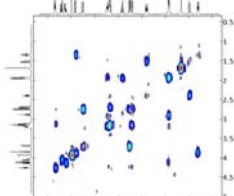
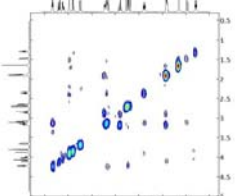
Con el fin de determinar la concentración límite a la cual las secuencias homonucleares 2D UF-COSY y UF-TOCSY son capaces de dar lugar a un espectro en un **solo scan** ($ns=1$) en condiciones de relación S/R adecuadas, se han empleado muestras de estricnina a distintas concentraciones. Esta molécula es usada con frecuencia como muestra patrón en el desarrollo y optimización de secuencias de pulsos.

Para un espectrómetro de 500 MHz, dotado de una sonda de RF BBO se realizaron pruebas a 80, 40 y 20 mM. Por debajo de esta última concentración, se requieren como mínimo dos *scans* (ns) para obtener un espectro en condiciones de S/R adecuadas. Por tanto, para estas secuencias homonucleares y con la intensidad de campo magnético empleado, 20 mM se puede tomar como el valor límite de sensibilidad. En la Tabla 1.2 y 1.3 se observan los espectros 2D UF-COSY y UF-TOCSY obtenidos para cada concentración, tanto para la codificación modulada en amplitud (A.M.) como la de tiempo constante (C.T.).

En las secuencia UF-TOCSY se prueban diferentes tiempos de mezcla (d_9) desde 60 hasta 100 ms. En cada uno de estos espectros se observa cómo se potencian o debilitan diferentes señales de cruce. Esto es causado por la variación de la constante de acoplamiento (J) para cada una de las diferentes correlaciones y del tiempo de relajación de los espines, el cual no es exactamente igual para todos. Finalmente se presentan los espectros UF-TOCSY con 80 ms, pues son los que en general muestran un mayor número de señales de correlación.

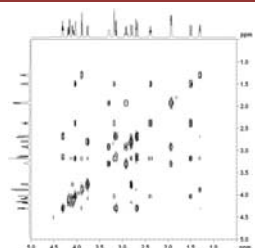
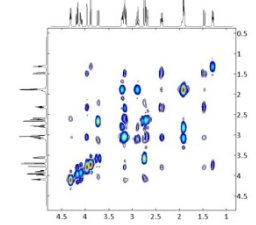
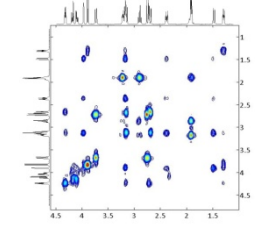
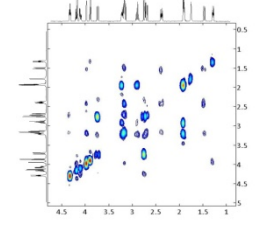
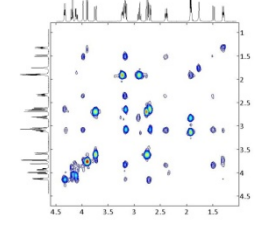
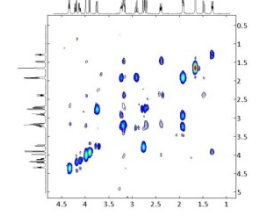
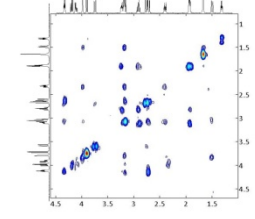
A medida que disminuye la concentración de la muestra estudiada, se hace necesario aumentar la ganancia del receptor (rg), pues la cantidad de señal es cada vez menor. Se puede encontrar una descripción más detallada de los parámetros de adquisición de estos experimentos en el apartado VI.1.1

Tabla 1.2: Límites de detección para secuencias de 2D UF-COSY (muestra de estricnina en CDCl_3)

Límite de detección secuencia 2D UF-COSY		
Espectro tradicional		
100 mM		
Espectros UF-NMR		
	COSY A.M.	COSY C.T
80 mM (13.4 mg en 0.5 mL de CDCl ₃)	<i>ns=1; rg=4k</i> 	<i>ns=1; rg=10k</i> 
40 mM (6.7 mg en 0.5 mL de CDCl ₃)	<i>ns=1; rg=10k</i> 	<i>ns=1; rg=16k</i> 
20 mM (3.4 mg en 0.5 mL de CDCl ₃)	<i>ns=2; rg=32k</i> 	<i>ns=2; rg=45k</i> 

ns=número de *scans* y *rg*=valor de la ganancia del receptor.

Tabla 1.3: Límites de detección para secuencias de 2D UF-TOCSY (muestra de estricnina en CDCl_3)

Límite de detección secuencia 2D UF-TOCSY		
Espectro tradicional		
100 mM		
Espectros UF-NMR		
	TOCSY A.M.	TOCSY C.T.
80 mM (13.4 mg en 0.5 mL de CDCl ₃)	<i>ns=1; rg=10k; d9=80ms</i> 	<i>ns=1; rg=10k; d9=80 ms</i> 
40 mM (6.7 mg en 0.5 mL de CDCl ₃)	<i>ns=1; rg=24k; d9=80ms</i> 	<i>ns=1; rg=16k; d9=80 ms</i> 
20 mM (3.4 mg en 0.5 mL de CDCl ₃)	<i>ns=2; rg=32k; d9=80ms</i> 	<i>ns=2; rg=45k; d9=60ms</i> 

ns = número de *scans*, rg =valor de la ganancia del receptor y $d9$ = tiempo de mezcla empleado.

1.1.2. Límites de detección para las secuencias de acoplamiento escalar heteronuclear 2D UF-HSQC y 2D UF-HMBC

Correlaciones ^1H , ^{13}C : Las secuencias de acoplamiento heteronuclear 2D UF-HSQC y UF-HMBC requieren siempre la adquisición de un mínimo de dos *scans*, $ns=2$, con el fin de eliminar las señales ^1H , ^{13}C presentes en sus espectros. En cada *scan* la fase del primer pulso *chirp* varía en 180° , a la vez que se desplaza la fase del receptor que está en concordancia con la fase del primer pulso de excitación.

Los espectros UF-HSQC y UF-HMBC son adquiridos con la misma secuencia modulada en amplitud, codificando la correlación mediante pulsos chirp de 90° . La diferencia entre ellos radica en el tiempo de espera d el cual se define igual al valor de $1/4J$, donde J es la constante de acoplamiento H,C de las señales de correlación esperadas. En los espectros UF-HSQC, se toma un valor de $J=145\text{Hz}$, para el acoplamiento ^1H , ^{13}C a un enlace ($^1J_{\text{C,H}}$) y para los espectros UF-HMBC un valor promedio de 9 Hz, para el acoplamiento a dos o más enlaces, ($^nJ_{\text{C,H}}$, $n=2,3$).

Para determinar la concentración límite que permite obtener espectros de correlación heteronuclear 2D ^1H , ^{13}C UF-HSQC y UF-HMBC, en dos barridos ($ns=2$) y en condiciones de relación S/R adecuadas, se emplean muestras a diferentes concentraciones de 1-cloro butano sin ningún marcaje isotópico, entre 1 M y 300 mM.

Tal como se observa en la Tabla 1.4, para la secuencia ^1H , ^{13}C UF-HSQC el límite se encuentra en 300 mM, concentración a la cual se requiere de al menos 4 *scans* para obtener un espectro óptimo. Sin embargo, para la secuencia ^1H , ^{13}C UF-HMBC el límite es mayor y se encuentra en 500 mM, pues ya con esta concentración se requiere un mínimo de cuatro barridos. En esta última secuencia, se realizaron pruebas a diferentes valores del tiempo de espera d , para valores de J entre 10 y 8 Hz, mostrando como resultado aquellos espectros en los que es posible visualizar mayor número de correlaciones (generalmente 8 Hz).

Correlaciones ^1H , ^{31}P : Para determinar el límite de detección de la secuencia 2D UF-HMBC de correlación ^1H , ^{31}P se ha empleado la misma secuencia que para el sistema ^1H , ^{13}C , excepto por una diferencia experimental que radica en desconectar el desacoplador durante la adquisición. El intervalo d se ha ajustado para detectar acoplamientos con valores de J entre 8 y 10 Hz.

Tal como se muestra en la Tabla 1.1, el núcleo de ^{31}P posee una abundancia natural del 100% y una sensibilidad relativa elevada, lo que permite adquirir espectros ultrarrápidos en concentraciones mucho menores, en comparación a los espectros de correlación heteronuclear a corta o larga distancia ^1H , ^{13}C .

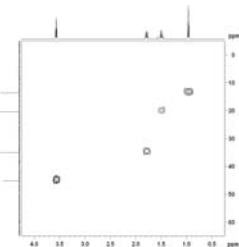
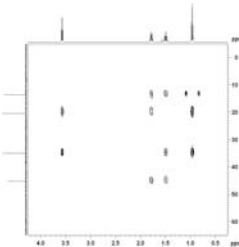
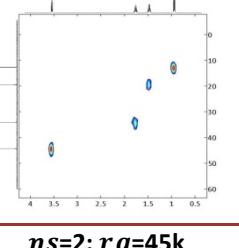
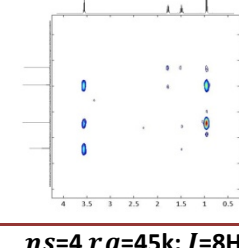
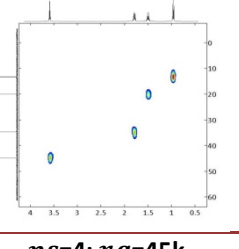
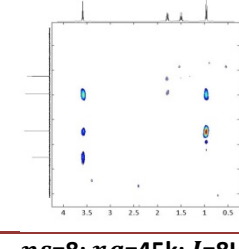
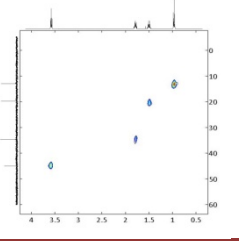
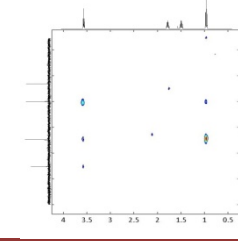
Para el sistema heteronuclear ^1H , ^{31}P , se ha empleado como patrón, una mezcla de fosfonato de dietilbencilo (FDB) y clorofosfato de dietilo (CFDE) 1:1 (Figura 1.1) con concentraciones que se han variado entre 100 y 25 mM. En la Tabla 1.5 se muestran los espectros adquiridos. La concentración límite para la obtención de espectros es de 50 mM. Por debajo de ella, es necesario adquirir más de 4 barridos para obtener espectros en condiciones de relación S/R adecuadas.



Figura 1.1. Mezcla de compuestos empleados (proporciones 1:1) en la detección del límite inferior de concentración al que se puede llegar con la secuencia UF-HMBC ^1H , ^{31}P .

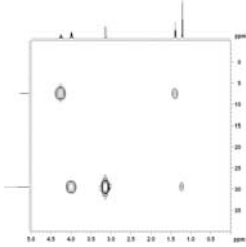
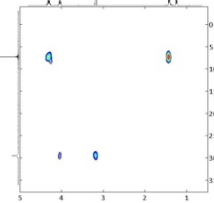
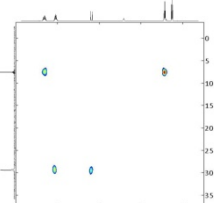
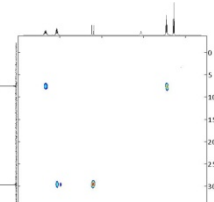
Para la adquisición de estos experimentos es necesario realizar la presaturación de la señal de correlación a 3.17 ppm, proveniente del grupo CH_2 del clorofosfato de dietilo. Esta señal es demasiado intensa, impidiendo que se observen otras correlaciones más débiles. Se puede encontrar una descripción más detallada de los parámetros de adquisición de estos experimentos en el apartado VI.1.2.

Tabla 1.4. Límites de detección para secuencias 2D UF-HSQC y UF-HMBC de correlación ^1H , ^{13}C (muestra de 1-clorobutano en CDCl_3)

Límite de detección secuencia 2D ^1H , ^{13}C UF-HSQC y UF-HMBC		
Espectros tradicionales	HSQC	HMBC
500 mM		
Espectros UF-NMR		
	HSQC A.M.	HMBC A.M.
1 M (44.3 mg en 0.45 mL de CDCl_3)	$ns=2; rg=32k$ 	$ns=2; rg=45k; J=8\text{Hz}$ 
500 mM (22.2 mg en 0.5 mL de CDCl_3)	$ns=2; rg=45k$ 	$ns=4 rg=45k; J=8\text{Hz}$ 
300 mM (13.9 mg en 0.5 mL de CDCl_3)	$ns=4; rg=45k$ 	$ns=8; rg=45k; J=8\text{Hz}$ 

ns =número de *scans*, rg =valor de la ganancia del receptor y J =valor de la constante de acoplamiento ($^nJ_{C,H}$, $n=2,3$).

Tabla 1.5: Límites de detección para la secuencia 2D UF-HMBC de correlación ^1H , ^{31}P (mezcla de fosfonato de dietilbencilo (FDB) y clorofosfonato de dietilo (CFDE) en CDCl_3)

Límite de detección secuencia 2D ^1H , ^{31}P UF-HMBC	
Espectro tradicional	
146.2 mM de FDB 96.6 mM de CFDE	
Espectros UF-NMR	
UF-HMBC A.M.	
100 mM (11.4 mg de FDB 8.6 mg de CFDE en 0.5 mL de CDCl_3)	$ns=2; rg=16k$ 
50 mM (5.7 mg de FDB 4.3 mg de CFDE en 0.5 mL de CDCl_3)	$ns=2; rg25k$ 
25 mM (2.9 mg de FDB 2.2 mg de CFDE en 0.5 mL de CDCl_3)	$ns=4; rg=32k$ 

ns =número de scans y rg =valor de la ganancia del receptor.

1.2. Calibración de los gradientes de campo magnético

Tal y como se comentó en el apartado II.3.1.1 los gradientes de campo magnético juegan un papel fundamental en la adquisición de los experimentos ultrarrápidos, tanto en la etapa de excitación, ya que son los encargados de generar la distribución espacial de frecuencias, como en la etapa de adquisición en la que permiten la formación de los ecos proporcionales a Ω_1 . Todo ello con el fin de dar origen a la segunda dimensión (F_1).

Durante el tiempo que en nuestro grupo se viene implementando y optimizando la técnica ultrarrápida, sistemáticamente se ha venido observando que el tamaño real de la ventana espectral en la dimensión indirecta, SW_1 , suele ser mayor que el tamaño calculado según el programa *paramadq* desarrollado para realizar este cómputo (ver apartado II.4.2). Estos cálculos se basan en la siguiente ecuación para el esquema modulado en amplitud:

$$SW_1 = \left| \frac{\Delta\Omega_{RF}\gamma_a G_a T_a}{2\gamma_e G_e T_e} \right| = \left| \frac{\gamma_a G_a T_a L}{2T_e} \right|$$

Esta relación permite observar la interdependencia entre el tamaño espectral en la dimensión indirecta y los gradientes de campo magnético, bien sean de adquisición, G_a , o de excitación G_e y entre otros parámetros, como por ejemplo la longitud de la muestra afectada, L .

Ello nos lleva a plantearnos que esta diferencia observada puede deberse a varios motivos: i) que el módulo de gradientes no alcance el valor de intensidad máximo indicado por la casa comercial de 53.5 G/cm, sobre el que se realizan los cálculos de SW_1 ; ii) que la intensidad real del gradiente aplicado no corresponde con el valor de los parámetros seleccionados por el usuario; iii) que la longitud de la muestra afectada, (zona de la muestra visible para la sonda de detección) nuevamente no se corresponde al valor indicado por la casa comercial, la cual en principio es 1.8 cm.

Por esa razón se procede a calibrar los gradientes de campo magnético mediante una rutina descrita para los experimentos de medida de coeficientes de difusión por RMN, los cuales requieren una calibración de los gradientes muy

precisa.^{171,172,173} Este procedimiento se lleva a cabo adquiriendo la imagen monodimensional de una muestra especialmente preparada para este fin. Dicha muestra consiste en un tubo de RMN convencional que contiene H₂O, e inmersa en ella se encuentra un disco de Teflón de dimensiones conocidas, posicionado en el centro de la zona visible de la sonda (Figura 1.2). Para esta operación es necesario el uso del calibre o medidor.

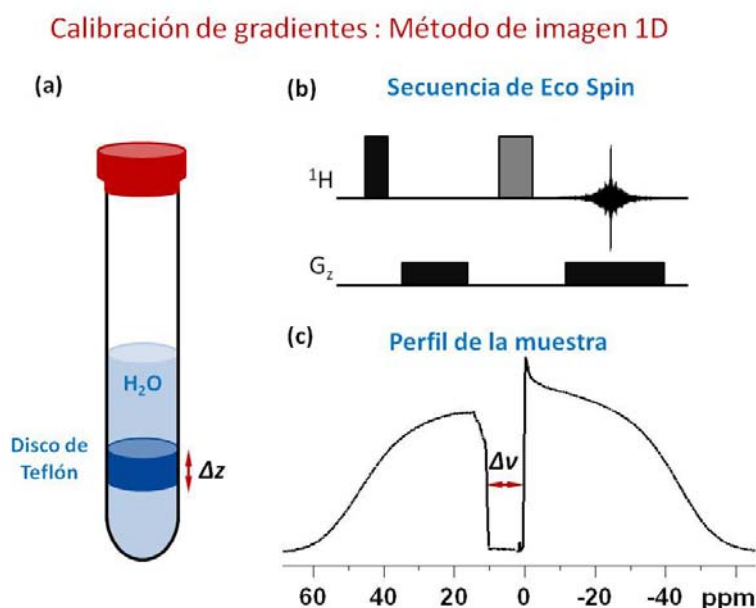


Figura 1.2. Método de calibración de gradientes mediante una imagen 1D de (a) una muestra de un tubo de RMN convencional, con un disco de Teflón de altura conocida, inmerso en H₂O. (b) Secuencia que eco de espín empleada (c) Perfil con una muesca proporcional a la anchura del disco y a la intensidad del gradiente empleado.

Tal y como se observa en la Figura 1.2.b, se emplea una secuencia *eco de spin*, a la que se le añade un gradiente entre los pulsos de 90° y de 180°. El segundo gradiente posee la misma intensidad que el primero, con el doble de duración y se aplica durante el periodo de detección. Los detalles en la preparación de la

¹⁷¹ Existe otra aproximación para la calibración de G_z , la cual está basada en medidas de difusión molecular. Esta requiere condiciones experimentales muy precisas, una calibración de temperatura exacta y una muestra de referencia (disolvente o disolución), con un coeficiente de difusión conocido. Una muestra adecuada puede ser H₂O en D₂O. Sin embargo esta estrategia no es tan directa en comparación con el método de la imagen 1D y adicionalmente, es muy dependiente de las condiciones de la muestra.

¹⁷² Claridge, T. D.W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2^{da} ed.; Elsevier: Hungría, 2009.

¹⁷³ Berguer, D.; Braun, S., *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.

muestra y las medidas realizadas se encuentran pormenorizados en el apartado VI.2.

Los datos resultantes se procesan en modo magnitud y se promedian con una función seno, la cual coincide con la forma del eco obtenido. El espectro muestra una caída del perfil o muesca (Figura 1.2.c), correspondiente a la región de la muestra que contiene el disco de teflón y que por tanto no contiene H₂O (se asume que el agua que se queda en la interface entre el tubo de RMN y el disco, es insignificante con respecto al espesor del propio disco). El ancho de la caída en hercios, $\Delta\nu$, permite calcular la intensidad del gradiente, G_z , a partir de la siguiente relación:

$$G_z = \frac{2\pi\Delta\nu}{\gamma\Delta_z}$$

Siendo γ la constante giromagnética del protón ($2.6751 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$) y Δ_z el espesor del disco, que en este caso es de 1.63 mm. Para una intensidad de gradiente del 10% se tiene un $\Delta\nu=3504 \text{ Hz}$. Esto nos proporciona una intensidad de gradiente calculada, $G_z \text{ cal.} = 5.05 \text{ G/cm}$ y por tanto una intensidad máxima total del gradiente, $G_{\text{max}} \text{ cal.} = 50.49 \text{ G/cm}$.

Tabla 1.6. Datos obtenidos en la calibración de los gradientes, para un disco de 1.63 mm

%	fracción	$\Delta\nu \text{ (Hz)}$ $\pm 6 \text{ Hz}$	$G_z \text{ cal. (G/cm)}$ $\pm 1.43 \text{ G/cm}$	$G_{\text{max}} \text{ cal. (G/cm)}$	$G_z \text{ teór. (G/cm)}$
5	0.05	1801	2.60	51.91	2.68
10	0.10	3507	5.05	50.54	5.35
15	0.15	5195	7.49	49.90	8.03
20	0.20	6850	9.87	49.35	10.70
25	0.25	8492	12.24	48.95	13.38
30	0.30	9866	14.22	47.39	16.05
35	0.35	11099	15.99	45.70	18.73
40	0.40	12670	18.26	45.64	21.40

En la Tabla 1.6 se observan los resultados obtenidos con incrementos en los valores de intensidad del gradiente empleados en la secuencia. A partir de ellos es posible obtener una medida de la linealidad del amplificador de los

gradientes. Lo que se espera es que a intensidades superiores de los gradientes, se produzca una muesca proporcional en el perfil de la muestra.

En la Figura 1.3 se muestra un gráfico comparativo entre los valores de la intensidad calculados y teóricos para diferentes porcentajes de los gradientes empleados en el experimento. El gráfico muestra la tendencia lineal del gradiente; sin embargo, dicha linealidad no se corresponde con la esperada a partir del valor de intensidad máxima proporcionado por la casa comercial (53.5 G/cm). Asimismo, se observa una mayor diferencia entre los valores calculados y teóricos a medida que se emplean porcentajes de gradiente superiores. El valor utilizado siempre ha sido menor del 40%, ya que a proporciones superiores, no es posible visualizar la señal debido al efecto de la difusión del agua, impidiendo así, observar el perfil de la muestra.

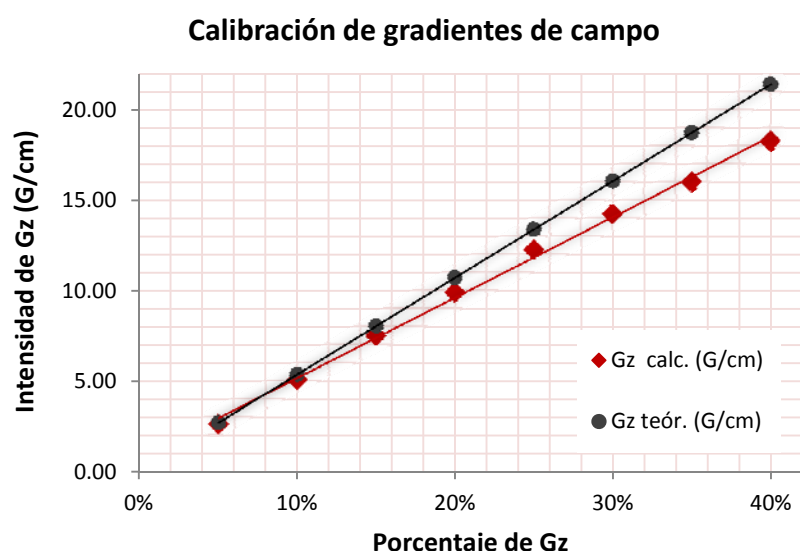


Figura 1.3. Recta de calibración de la linealidad del módulo de gradientes en el intervalo entre 5 y 40%. En rojo se muestran los datos y recta de ajuste a ellos para los valores de calculados y en gris se representan los datos y su recta de ajuste para los valores de teóricos.

La recta que mejor se ajusta a los valores de calculados viene dada por la ecuación: $y = 44.50x + 0.72$, con un coeficiente de correlación $r = 0.9974$. De igual manera, la recta que mejor se ajusta a los valores de teóricos es la que marca la siguiente ecuación: $y = 53.50x + 8E^{-15}$, que como es de esperar, presenta un coeficiente de correlación $r = 1$. Estas líneas de tendencia también se observan en la Figura 1.3, en rojo para los valores calculados y en gris para los valores teóricos.

Así, es posible concluir que la intensidad máxima del gradiente de campo para este equipo de RMN, de 500 MHz en concreto, es menor al valor que indica la casa comercial. Esto está en consonancia con el hecho de que en todos los experimentos de UF-NMR, el valor del tamaño espectral, SW_1 es siempre mayor que el calculado teóricamente, lo que significa que el gradiente de adquisición real siempre es menor que el que se indica en los parámetros de adquisición de la máquina.

La diferencia entre el gradiente G_z real calculado y el gradiente G_z teórico calculado va en aumento cuanto mayor es el porcentaje de intensidad del gradiente aplicado.

Debido a estos resultados, que muestran la dificultad de utilización de valores nominales concretos de la intensidad del gradiente, se decidió incluir una utilidad de calibración en el programa de procesamiento **XprocUFnmr** desarrollado en nuestro grupo.¹⁷⁴ Dicha utilidad permite calcular la anchura espectral real, SW_1 a partir de la posición conocida de dos señales del espectro (apartado II.4.2).

En resumen, en el Capítulo 1 se han abordado algunos problemas experimentales que se derivan de características intrínsecas de la técnica de UF-NMR, como lo son su baja sensibilidad y el necesario dominio de los gradientes de campo magnético. Los resultados conseguidos permiten concluir que en el equipo de 500 MHz de las instalaciones del CAI de RMN y RSE de la UCM:

- La concentración límite que permite obtener espectros de correlación homonuclear 2D UF-COSY y 2D UF-TOCSY en un solo *scan* ($ns=1$) y en condiciones de relación S/R adecuadas, es 20 mM.
- La concentración límite con la que se ha obtenido espectros de correlación heteronuclear 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ UF-HSQC en dos *scans* ($ns=2$) y en condiciones de relación S/R adecuadas, es de 300 mM, mientras que para espectros 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ UF-HMBC es de 500 mM.

¹⁷⁴ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

- La concentración límite que permite obtener espectros de correlación heteronuclear ^1H , ^{31}P UF-HMBC en dos *scans* ($ns=2$) y en condiciones de relación S/R adecuadas, es de 50 mM.
- La intensidad máxima del gradiente de campo generado en este equipo en concreto, es inferior al valor que indica la casa comercial (53.5 G/cm). Si bien la intensidad del modulo de gradientes aumenta de manera lineal en el rango estudiado, su comportamiento no se corresponde con lo esperado.
- La diferencia entre el gradiente G_z real calculado y el gradiente G_z teórico crece cuanto mayor es el porcentaje de intensidad del gradiente aplicado. Debido a ello, la calibración de la escala de los espectros de UF-NMR en la dimensión indirecta, se realizará mediante la utilidad diseñada para tal fin, la cual se incluye en el programa de procesado **XprocUFnmr** desarrollado en nuestro grupo.

Capítulo 2: Estudios de sistemas dinámicos mediante técnicas de UF-NMR 2D basadas en acoplamientos homonucleares

Como se ha comentado ampliamente en los anteriores apartados, la drástica reducción del tiempo de adquisición que se puede conseguir mediante la espectroscopía de UF-NMR 2D, hace que esta técnica pueda proporcionar resultados relevantes en la monitorización de sistemas dinámicos realizada en tiempo real. Bajo esta perspectiva, el objetivo principal de esta Tesis se basa en la aplicación de diferentes secuencias de pulsos UF-NMR, desarrolladas en nuestro grupo de trabajo, para el seguimiento de reacciones orgánicas que han constituido una parte importante dentro de las líneas de investigación desarrolladas por nosotros. Para ello se aplicarán secuencias de pulsos de UF-NMR dinámicas, de correlación homonuclear, heteronuclear y combinadas.

El estudio comienza con la monitorización de sistemas reactivos a través de una secuencia de pulsos homonuclear, 2D UF-TOCSY (*UltraFast TOfal Correlation Spectroscopy*).

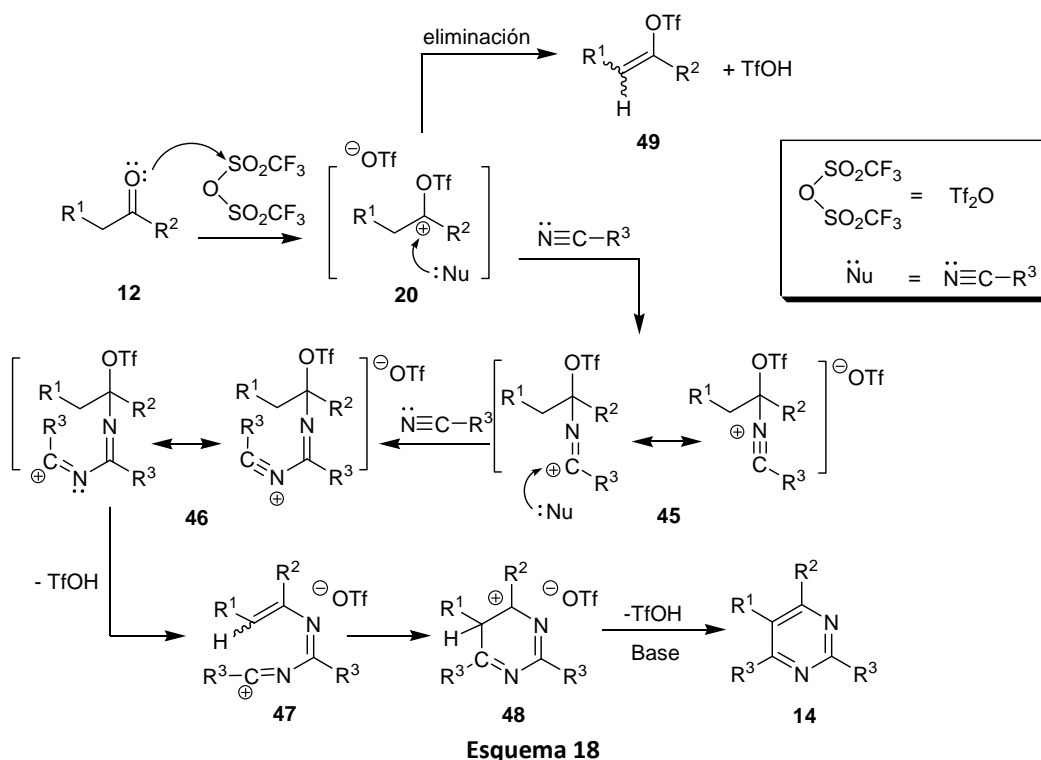
2.1. 2D UF-TOCSY: Estudio mecanístico de la reacción de la 3-pentanona y anhídrido trifílico (Tf₂O) con acetonitrilo-*d*₃

En los antecedentes de esta Tesis (apartado II.6.3) se han comentado detalles acerca de la ruta mecanística propuesta para la reacción de formación de pirimidinas a partir de diferentes cetonas y anhídrido trifílico (Tf₂O), en presencia de nitrilos como nucleófilos, que puede considerarse un caso particular de la reacción de compuestos carbonílicos con electrófilos fuertes. En el Esquema 18, se muestra el mecanismo propuesto,¹⁷⁵ que implica el ataque electrófilo del Tf₂O sobre el carbono carbonílico de la cetona **12** de partida, dando lugar a la formación de un catión trifiloxicarbenio **20**. Esta especie puede sufrir la eliminación de ácido trifílico (TfOH) para dar lugar a una mezcla de los triflatos E/Z **49** como productos secundarios. Otra alternativa consiste en la doble y sucesiva captura nucleófila mediante dos moléculas de nitrilo, conduciendo a la sal de nitrilo **46**, que tras eliminación de TfOH da lugar al intermedio **47**. Su posterior ciclación origina **48**, que finalmente da lugar a la pirimidina **14** como producto principal.

¹⁷⁵ Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Chioua, M; Chioua, R.; Sánchez, A. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 10053-10058.

En la mayoría de los casos la formación de la pirimidina **14** tiene lugar con un alto rendimiento en comparación con la formación de la mezcla de triflatos de vinilo **49**. Ello da una idea de la eficiencia con la que es atrapado nucleófilamente el catión **20**. Esta captura se produce pues a mayor velocidad que la eliminación.

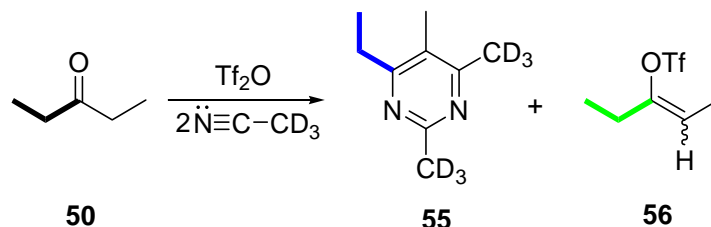
Las sales de nitrilo propuestas en el mecanismo (Esquema 18), también se han formulado en otras reacciones de compuestos carbonílicos con reactivos electrófilos y pueden ser relativamente estables dada las posibilidades de deslocalización de la carga positiva entre los átomos de carbono y nitrógeno del grupo nitrilo.¹⁷⁶ Sin embargo, no se han encontrado hasta ahora evidencias espectroscópicas de su existencia.



Se decidió pues abordar la monitorización en tiempo real de este tipo de reacciones. Para ello, se escogió el sistema reactivo formado por una cetona alifática sencilla como es la 3-pentanona **50** y su reacción con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 , dando como producto principal a la 4-etil-2,5,6-

¹⁷⁶ Kanemasa, S. *Science of Synthesis*, **2004**, 19, 53-65.

trimetilpirimidina- d_6 **55** y al triflato de (E/Z)-1-etilprop-1-en-1-ilo **56** como subproducto. (Esquema 19).



Esquema 19

Nuestro objetivo es monitorizar esta reacción desde su inicio, con el fin de detectar las posibles especies intermedias originadas, que es de esperar posean cortos tiempos de vida media. Para ello se aplicará la secuencia 2D UF-TOCSY. A través de los diferentes espectros que se han de obtener y conforme avance la reacción, deberían observarse señales de correlación TOCSY en la medida en que se vayan produciendo nuevas especies. Como marcador estructural de estos cambios nos apoyaremos en las señales del grupo etilo, presente en la molécula de partida y en las finales y, por tanto, presente también en los intermedios que han de formarse a lo largo de la reacción. Así, habremos de observar la evolución del resto etilo de la 3-pentanona, que ha de transformarse en grupo 4-etilo de la pirimidina final.

El esquema de la secuencia 2D UF-TOCSY que se ha empleado, se muestra en la Figura 2.1. y ha sido desarrollado por nuestro grupo de investigación.¹⁷⁷ Análogamente a una secuencia 2D TOCSY tradicional, permite observar correlaciones entre los diferentes núcleos de ^1H a corta y larga distancia (2J , 3J , 4J).

¹⁷⁷ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

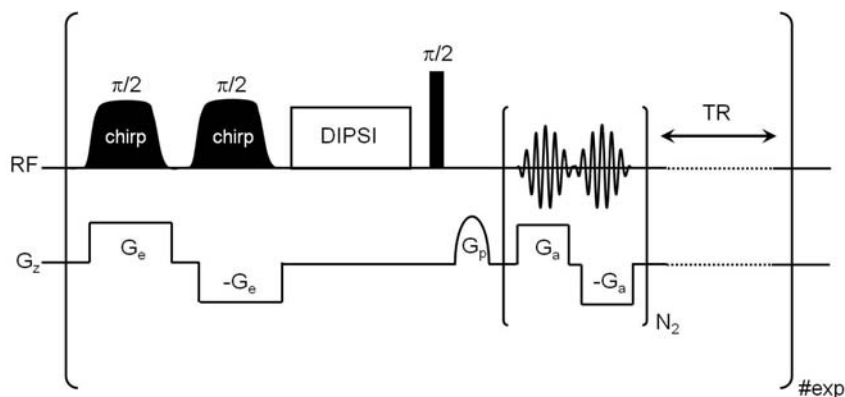


Figura 2.1. Esquema de la secuencia 2D UF-TOCSY dinámica, modulada en amplitud, empleada en la monitorización de sistemas dinámicos en tiempo real.

La secuencia UF-TOCSY emplea dos pulsos $\pi/2$ chirp para la excitación y almacenamiento, lo que da lugar a una esquema de excitación modulado según la amplitud de la magnetización. Seguidamente se aplica la etapa de mezcla, que para este caso es un bloque tipo DIPSI, tras el cual interviene un pulso duro de 90° que devuelve la magnetización al plano transversal, para finalmente ser medida mediante la secuencia EPSI (para más detalle ver apartado II.3). Otro aspecto particular de esta secuencia radica en que se repite de forma continua, de modo que se adquieren automáticamente experimentos UF-TOCSY según avanza el proceso dinámico. Entre cada dos experimentos consecutivos es necesario esperar un tiempo de repetición TR , (Figura 2.1), de suficiente magnitud como para permitir la relajación completa de la magnetización del sistema estudiado.

Un aspecto importante y novedoso se refiere a que la reacción estudiada se lleva a cabo en un tubo de 5 mm dispuesto en el interior de un espectrómetro de RMN. Para la adición de los reactivos desde el exterior, hasta el interior del tubo de RMN situado en el imán, se ha desarrollado un sencillo sistema de inyección, que se muestra en la Figura 2.2 y que permite realizar el seguimiento desde los primeros instantes del proceso. La descripción de dicho sistema puede ser consultada en el apartado VI.3.

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro de 500 MHz dotado de una sonda de RF BBO a 298 K. Una vez ensamblado el dispositivo de inyección, el tubo de resonancia se introduce en el imán y se llevan a cabo los

ajustes estándar (valores del nivel del lock, sintonía de la sonda y homogeneidad del campo), para dar inicio seguidamente al experimento de RMN.

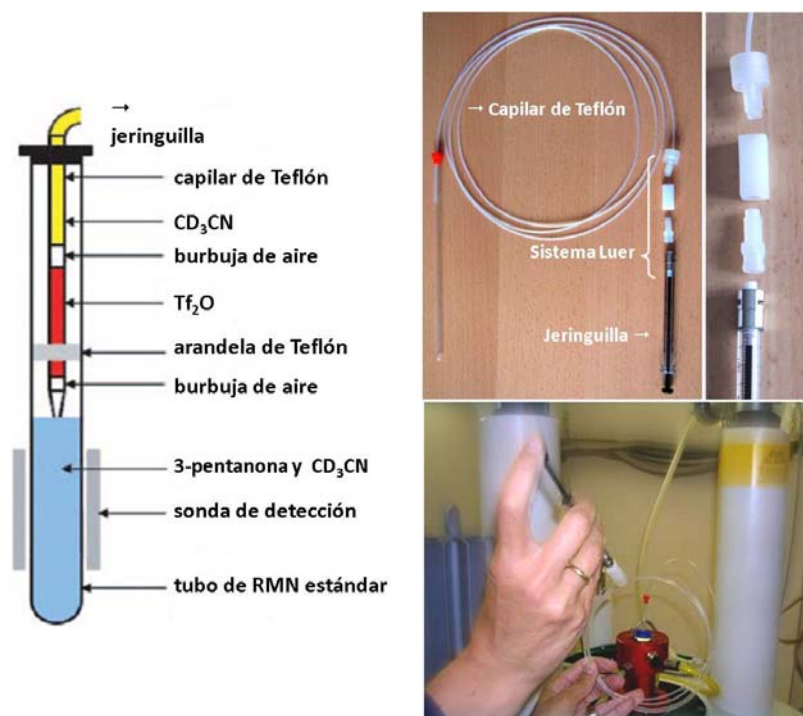


Figura 2.2. Sistema de inyección y mezcla. Este sencillo dispositivo permite adicionar los reactivos desde el exterior del espectrómetro y asegura que la reacción sea monitorizada desde tiempo cero.

En el tubo de RMN se dispone la 3-pentanona y el acetonitrilo- d_3 como disolvente y en el interior de la cánula de teflón, el Tf_2O . La adquisición del experimento dinámico de RMN se inicia con antelación a la inyección del reactivo (Tf_2O) y se registran dos experimentos UF-TOCSY previamente. La adquisición continúa durante la inyección y reacción posterior. Aunque el tiempo necesario para la inyección no es mayor que el que se necesita para adquirir un experimento, los cambios en la susceptibilidad magnética de la muestra afectan de forma inmediata. Así, los artefactos producidos por la difusión de los reactivos y la inhomogeneidad de la muestra se pueden apreciar en, al menos, los dos o tres espectros posteriores. Tras ellos, la homogeneidad de la muestra se recupera casi en su totalidad y los efectos de la difusión dejan de ser importantes por lo que la resolución conseguida es ya comparable a la de los experimentos estáticos.

En total se adquieren 525 espectros 2D UF-TOCSY cada 10 segundos (TR) en un tiempo total de 88.7 minutos. Los datos experimentales, así como los parámetros de adquisición optimizados para este experimento se han incluido en el apartado VI.4. El rango espectral estudiado es la zona alifática que comprende desde 0.0 hasta 3.5 ppm aproximadamente, lo que permite seguir los diferentes cambios producidos en los alrededores estructurales del resto etilo de la 3-pentanona. Se aplicó un tiempo de mezcla de 20 ms, lo que da lugar a espectros de correlación a corta distancia, equivalentes a espectros COSY (*CORrelation Spectroscopy*). Con mayores valores del tiempo de mezcla, se podrían detectar señales a larga distancia (TOCSY), pero en ese caso los espectros muestran un mayor número de señales de correlación, que son innecesarias para el análisis estructural y hacen más difícil su asignación. Cada espectro UF-TOCSY fue adquirido en tan solo 0.138 s.

En la Figura 2.3 se muestran una selección de los espectros 2D UF-TOCSY obtenidos en diferentes instantes de la reacción. En ellos se observa la paulatina desaparición de señales de correlación y la aparición de nuevas. Así, el espectro 1 registrado a los 0.34 min del comienzo, muestra las señales de correlación inicial a 2.48-1.04 ppm, pertenecientes al resto etilo del reactivo de partida, la 3-pentanona **50** (marcadas en **negro**). La intensidad de estas señales disminuye con el tiempo (espectros 2, 3, 4 y 5) y está ausente en el espectro 6 registrado a los 3.55 minutos.

Adicionalmente, durante el transcurso de la reacción también se observan una serie de correlaciones de carácter transitorio ya que aparecen y desaparecen posteriormente. Así, desde el espectro 2, registrado a los 0.68 minutos, es posible observar nuevas señales de cruce a 1.97-1.00 ppm (marcadas en **rosa**) que se desvanecen hasta desaparecer completamente tras el espectro 10. Igualmente, desde el espectro 5, registrado a 1.86 minutos y hasta el espectro 11, se observa una nueva correlación a 2.34-1.6 ppm (marcada en **gris**), perteneciente a otra especie intermediaria. Es importante resaltar que tanto su aparición como su desaparición tienen lugar con posterioridad a la especie intermedia **rosa**, lo que parece indicar que se trata de un intermedio de reacción formado por la evolución de éste.

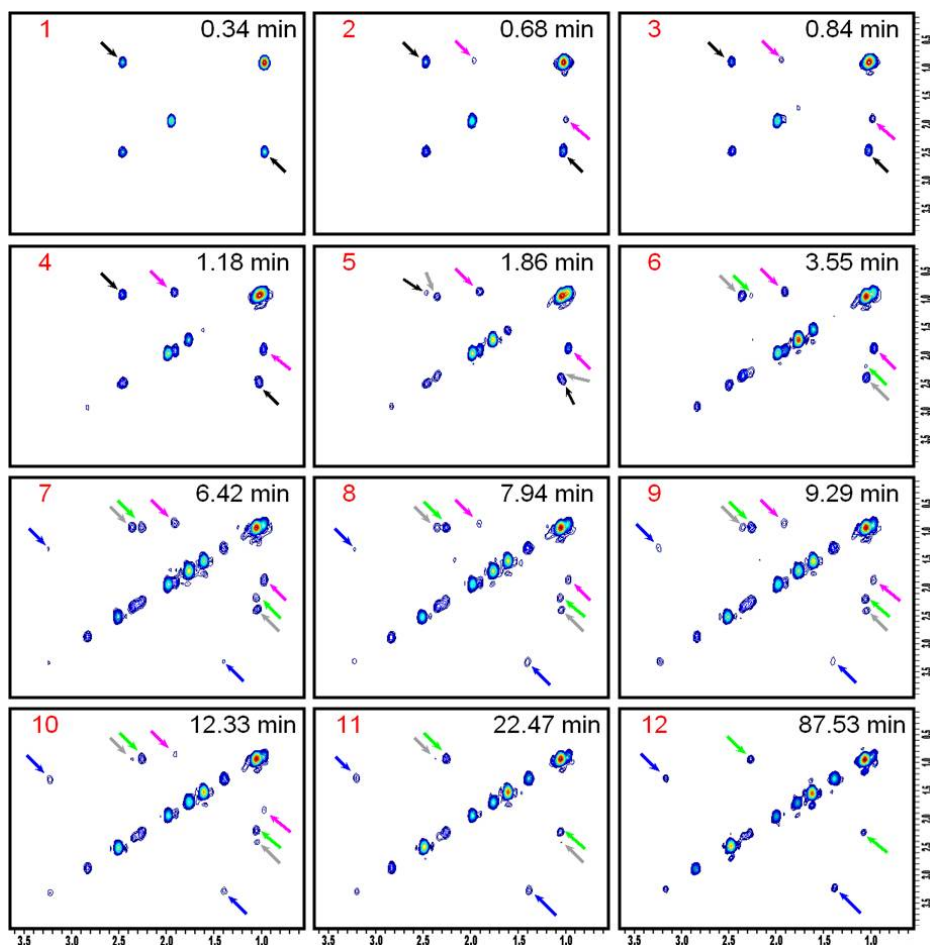


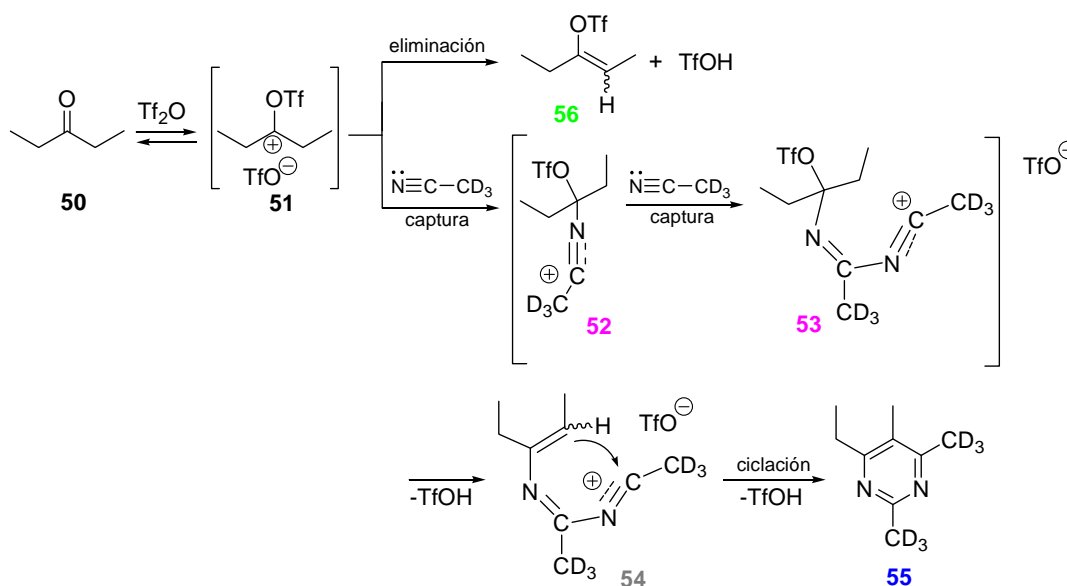
Figura 2.3. Selección de espectros 2D UF-TOCOSY obtenidos en el seguimiento de la reacción de la 3-pentanona y Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar a la formación de la 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina- d_6 **55**.

A partir del minuto 3.55 se observa la presencia de las señales de correlación a 2.36-1.08 ppm asignables al producto secundario (Z/E)-triflato de vinilo, **56** (marcado en verde) y desde los 6.42 min las señales de cruce a 3.15-1.38 ppm correspondientes a la pirimidina final **55** (marcada en azul). Estas señales de correlación han sido confirmadas mediante experimentos tradicionales de RMN 1D y 2D (apartado VI.9.1).

Las diferentes estructuras propuestas en el mecanismo de reacción mencionado con anterioridad, se han sometido a modelización mediante el programa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8. Ello ha permitido asignar de manera satisfactoria todas las señales de correlación obtenidas en los

espectros UF-TOCSY registrados. De esta forma, ha sido posible la asignación de las correlaciones marcadas en rosa a las sales de nitrilo intermedias **52/53**, correspondientes a la primera captura nucleófila del intermedio **51**. Las correlaciones marcadas en gris pertenecen a la especie catiónica Z/E nitrilio-olefínica **54**, formada a partir de **52/53** tras la captura de una nueva molécula de nitrilo y eliminación de TfOH.

En el Esquema 20 se muestra el mecanismo que se deduce del análisis estructural de los espectros UF-TOCSY obtenidos y de los datos de modelización realizados. Este mecanismo coincide muy satisfactoriamente con el propuesto con anterioridad, constituyendo una importante prueba espectroscópica de las especies intermediarias implicadas en él y pone de manifiesto una vez más las idóneas características de la UF-NMR para la monitorización de reacciones orgánicas.



Esquema 20

La integración de las señales de correlación presentes en los espectros UF-TOCSY proporciona una valiosa información acerca de la concentración de las especies participantes. Así, en la Figura 2.4 se muestra el valor de la integral para cada especie detectada durante el transcurso de la reacción, frente al tiempo del experimento dinámico 2D UF-TOCSY. A partir de estos valores es posible calcular el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de cada intermedio. Además, mediante las curvas

obtenidas es posible seguir el comportamiento que manifiesta cada una de las especies: así, la 3-pentanona (**50**) decae inmediatamente una vez iniciada la reacción; los intermedios (**52/53** y **54**) aparecen rápidamente al inicio del proceso, si bien los intermedios (**52/53**) se forman claramente con anterioridad a **54**. Ambos van desapareciendo al mismo tiempo que los dos productos finales, la pirimidina (**55**) y el triflato vinílico (**56**), comienzan a detectarse, aumentando su intensidad según avanza la reacción.

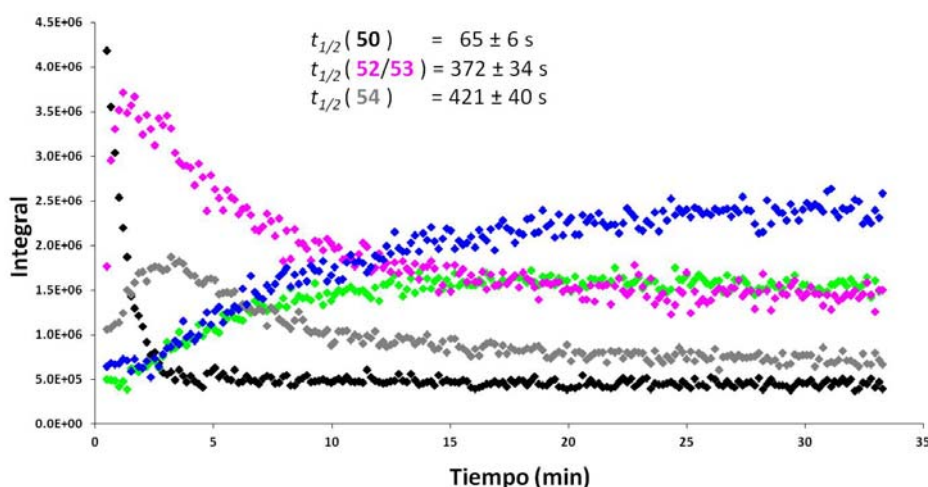


Figura 2.4. Integrales promedio de las señales de correlación de las especies detectadas como función del tiempo.

Para el cálculo de las integrales se ha empleado un programa escrito en lenguaje Matlab 7.11. y diseñado en nuestro grupo de trabajo.¹⁷⁸ El $t_{1/2}$ se calcula mediante el ajuste de las curvas a la ecuación $I(\tau) = I_0 e^{(-\tau/t_{1/2})} + I_\infty$. En cada caso se ha escogido un punto para el valor de I_0 diferente. Para la 3-pentanona (**50**) se seleccionó el primer punto medido, que corresponde a 30.42 s. Para los intermedios (**52/53** y **54**) se han seleccionado 71 s y 193 s respectivamente. Los valores obtenidos del tiempo de vida media se muestran en la Figura 2.4.

A partir de los 525 espectros UF-TOCSYs obtenidos en el estudio de esta reacción se ha realizado una animación, que se adjunta en el CD de esta memoria. Los

¹⁷⁸ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

resultados expuestos se han publicado en *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6274-6277.

En resumen, en el Capítulo 2 se ha abordado la aplicación de la secuencia de correlación homonuclear 2D UF-TOCSY desarrollado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo, al estudio en tiempo real de la reacción de la 3-pentanona con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 , que da lugar a la 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina- d_6 como producto principal. Los resultados conseguidos han sido muy satisfactorios y cabe destacar los siguientes aspectos:

- Se han optimizado los parámetros de adquisición para obtener la relación S/R y la resolución óptima, con el objetivo de aplicarla al seguimiento de un sistema dinámico, en tiempo real.
- La reacción se ha llevado a cabo en un equipo estándar de RMN de 500 MHz en el interior de un tubo de resonancia de 5 mm. Se han registrado 525 espectros 2D UF-TOCSY en un tiempo de 87.53 min, a partir de los cuales se puede seguir el transcurso de la reacción.
- Se ha detectado por primera vez, la presencia de las especies catiónicas intermedias **52/53** y **54** para las cuales hasta ahora y según nuestro conocimiento, no se había encontrado evidencia espectroscópica ni química de su existencia.
- Se ha confirmado la asignación estructural de las especies detectadas de mediante modelización por el programa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8. Los valores de los desplazamientos químicos observados están en muy buena concordancia con los valores calculados.
- Ha sido posible obtener datos cinéticos del proceso estudiado, lo que aporta valiosa información relativa a la concentración de las especies participantes y que permite calcular el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de cada intermedio.
- Estos resultados permiten explicar satisfactoriamente el mecanismo propuesto con anterioridad, poniendo de manifiesto las idóneas características de la UF-NMR para la monitorización de reacciones orgánicas.

Capítulo 3: Estudios de sistemas dinámicos mediante técnicas de UF-NMR 2D basadas en acoplamientos heteronucleares

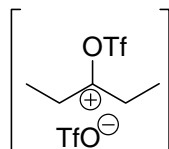
Las secuencias ultrarrápidas heteronucleares presentan problemas de detección derivados de la baja relación S/R de las señales de correlación obtenidas, en comparación con las secuencias ultrarrápidas homonucleares. Por ello, en el estudio de sistemas con núcleos de baja sensibilidad (^{13}C , ^{15}N) resulta casi imprescindible recurrir a sustratos de partida marcados. Sin embargo, a lo largo de este estudio también se mostrarán resultados partiendo de sustratos sin marcar. Adicionalmente, en las secuencias heteronucleares de UF-NMR se agudizan los problemas experimentales derivados de la limitación que poseen las anchuras espectrales, tal como se menciona en el apartado II.4.1.

El análisis acerca de aplicabilidad de diferentes secuencias ultrarrápidas heteronucleares 2D (UF-HSQC, UF-HMBC, UF-HSQC Selectivo) se abordará continuando con el sistema químico-orgánico utilizado en la monitorización dinámica mediante secuencias ultrarrápidas homonucleares, comenzando con la secuencia 2D UF-HSQC.

3.1. Estudio mecanístico de la reacción de la acetofenona marcada con ^{13}C y anhídrido trifílico (Tf_2O), empleando secuencias de UF-NMR de acoplamiento heteronuclear

Como continuación del capítulo dedicado al estudio de la monitorización mediante técnicas ultrarrápidas homonucleares, se aborda ahora la posibilidad de realizar estudios dinámicos en tiempo real, empleando técnicas heteronucleares como 2D ^1H , ^{13}C UF-HSQC y UF-HMBC.

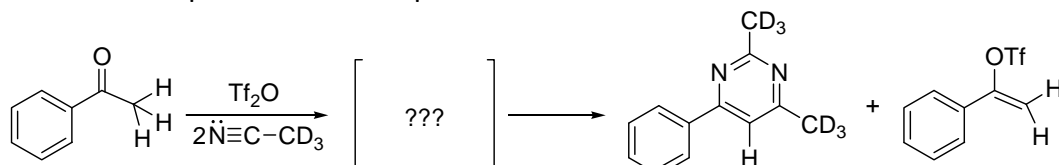
A pesar de los buenos resultados conseguidos en el estudio mecanístico de la reacción de la 3-pentanona y anhídrido trifílico (Tf_2O) mediante la secuencia 2D UF-TOCSY para su seguimiento (apartado 2.1), no ha sido posible obtener datos acerca del intermedio **51** (esquema 21). En otras palabras, no ha sido posible obtener información directa acerca de los cambios estructurales que sufre el centro reactivo (carbono carbonílico) del proceso estudiado.



51

Esquema 21

Con el objeto de aportar nuevos datos, se ha elegido la reacción de la acetofenona con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 , que conduce a la formación mayoritaria (90%) de la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 y el triflato de 1-fenilvinilo (10%) como producto minoritario (esquema 22). Esta reacción producirá especies que podrán ser monitorizadas por las secuencias heteronucleares y además por la naturaleza misma de sus estructuras, producirá especies más estables, debido a efectos de resonancia y deslocalización de carga. El empleo de acetonitrilo- d_3 elimina la necesidad de la supresión del disolvente durante la adquisición de los espectros de RMN.



Esquema 22

Derivado del problema de la baja sensibilidad asociado a las secuencias de UF-NMR de correlación ^1H , ^{13}C mencionados anteriormente (apartado 1.2), surge la necesidad de emplear productos marcados isotópicamente. A lo largo de este estudio se trabajará con acetofenona enriquecida en ^{13}C , bien en la posición α o β , dependiendo de las correlaciones que se quieran monitorizar y por ende las secuencias de pulsos empleadas, todo ello, con el fin de asegurar la detección de especies con cortos tiempos de vida.

Un estudio de estas características debe comenzar con la realización preliminar del seguimiento de la reacción desde tiempo cero (empleando para ello nuestro sistema de inyección, apartado VI.3), registrando espectros de ^1H -RMN a tiempos crecientes del proceso (Figura 3.1).

Este estudio revela el interés sobre varias zonas espectrales, ya que los cambios producidos en ellas dan una idea de la evolución de las especies participantes en

la reacción. Sobre la figura se muestran las señales en rojo y azul del producto de partida y final respectivamente y se observa también la presencia de otras señales que aparecen y desaparecen a lo largo del proceso, lo que indica su carácter transitorio durante el mismo.

Asimismo este estudio permite determinar el número y la amplitud de las diferentes ventanas espectrales que será necesario estudiar durante el seguimiento mediante las secuencias heteronucleares de UF-NMR. En la Figura 3.1 se observan con claridad las zonas en las que se producen cambios significativos en las señales de los productos e intermedios.

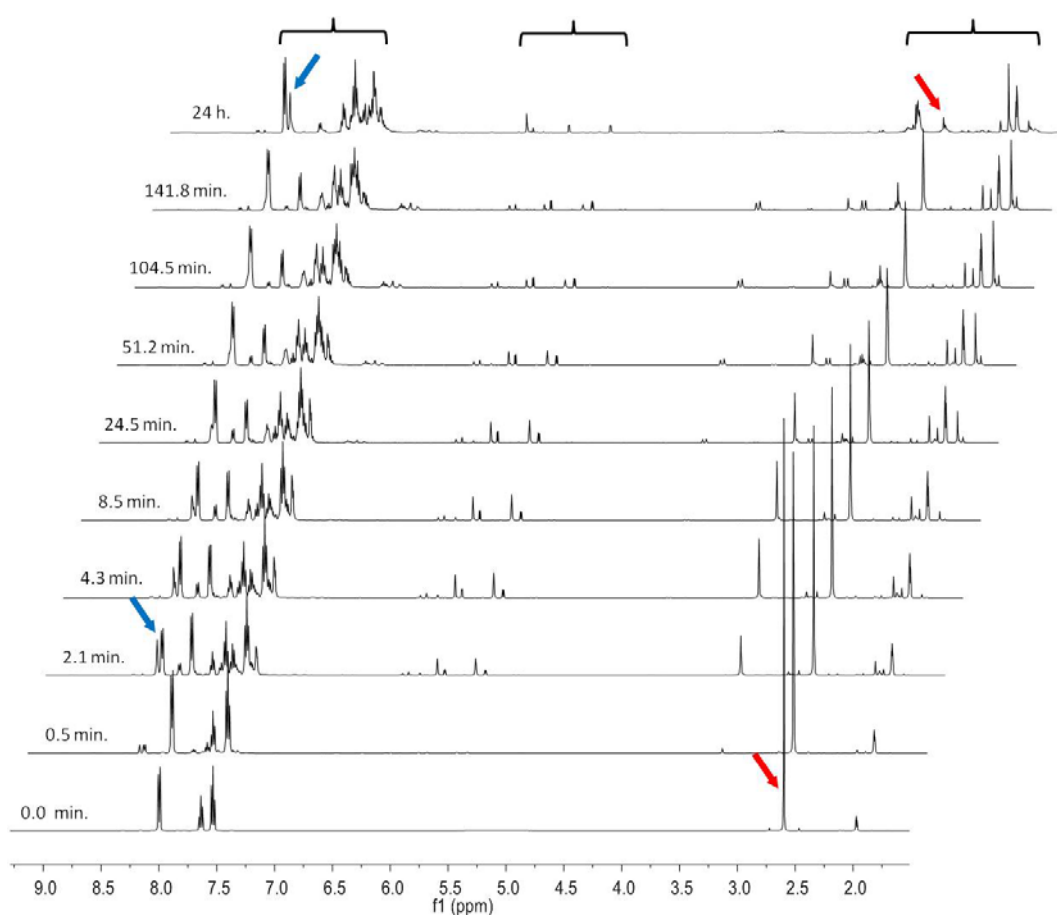
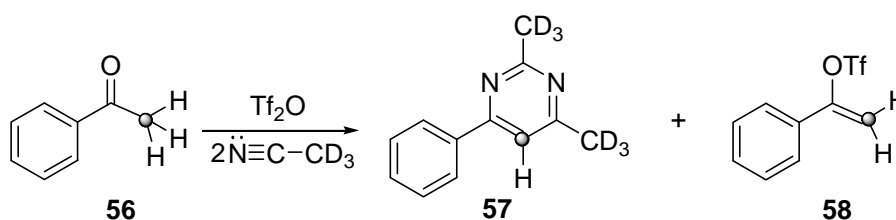


Figura 3.1. Seguimiento mediante espectroscopía de ^1H -RMN de la reacción de acetofenona (marcada en rojo) con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 , para dar lugar a la formación de la pirimidina 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 (marcada en azul).

3.1.1. 2D UF-HSQC: reacción de acetofenona- β - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O)

La monitorización mediante la secuencia heteronuclear ultrarrápida básica 2D UF-HSQC (*Ultrafast Heteronuclear Single-Quantum Correlation*), de manera análoga a la secuencia 2D HSQC tradicional, permite observar la variación en las correlaciones ^1H , ^{13}C derivadas del acoplamiento ($^1J_{\text{C,H}}$) del sistema reactivo estudiado. El análisis comienza con el estudio de la reacción de la acetofenona- β - ^{13}C **56** con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar como producto principal la 2,4-dimetil-5- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 **57** y el triflato de β - ^{13}C -1-fenilvinilo **58** como producto secundario (Esquema 23).

Se monitorizará la evolución de la correlación C-H del grupo metilo de la acetofenona- β - ^{13}C y su evolución durante el proceso hasta convertirse en el carbono C5 de la pirimidina final.



Esquema 23

El programa de pulsos UF-HSQC empleado en la monitorización del sistema reactivo, ha sido desarrollado por nuestro grupo¹⁷⁹ y se muestra en la Figura 3.2. Se trata de un esquema que hace uso de la técnica de UF-NMR modulada en amplitud, empleando pulsos *chirp* de 90° para la codificación espacial. De manera anterior y posterior a estos pulsos con forma, se aplican dos bloques INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) que permiten la codificación de la correlación y la transferencia de polarización. Del mismo modo que en la RMN tradicional, el tiempo d se define igual al valor de $1/4J = 1.72$ ms, donde J es la constante de acoplamiento de las señales buscadas, que para este caso tiene un valor de 145 Hz.

¹⁷⁹ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

En nuestras secuencias 2D UF-HSQC y UF-HMBC ^1H , ^{13}C hemos empleado un desacoplamiento de onda continua aplicado durante toda la etapa de adquisición, similar al que se realiza en la espectroscopía de RMN tradicional. Para este caso específico se ha empleado una secuencia GARP.¹⁸⁰ Este esquema difiere respecto a la secuencia planteada por Frydman,¹⁸¹ quien propone que durante la adquisición se empleen pulsos duros de 180° sobre el heteronucleo para desacoplar las señales.

Otro aspecto particular de esta secuencia radica en que se repite de forma continua, de modo que se adquieren automáticamente experimentos UF-HSQC según avanza el proceso dinámico. Entre cada dos experimentos consecutivos es por tanto necesario esperar un tiempo de repetición TR , (Figura 3.1), de suficiente magnitud como para permitir la relajación completa de la magnetización del sistema estudiado.

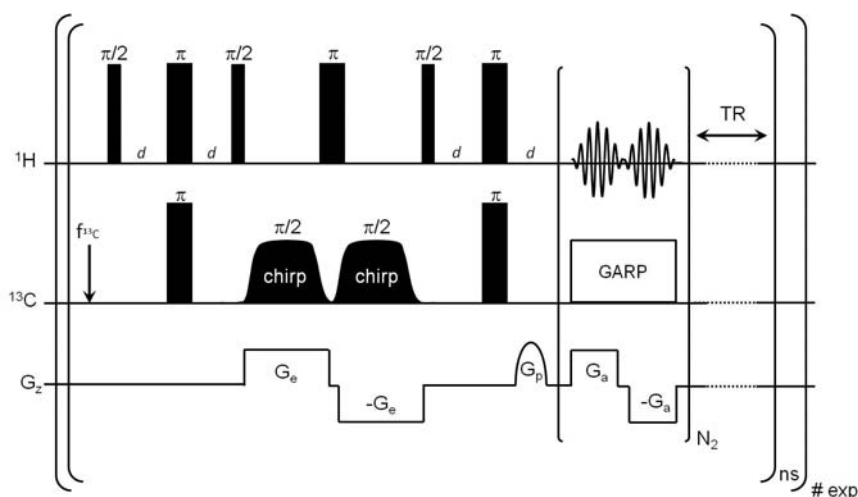


Figura 3.2. Esquema de la secuencia UF-HSQC dinámica empleada en la monitorización de sistemas dinámicos en tiempo real. El valor de la constante de acoplamiento se ajusta a un valor promedio de 145 Hz.

La reacción se realiza en el interior de un espectrómetro 500 MHz, equipado con una sonda de RF BBO a 298 K. Para la adición de los reactivos desde el exterior del equipo al interior del tubo de RMN se emplea el sistema de inyección descrito en el apartado VI.3.

¹⁸⁰ GARP es una secuencia compuesta por varios pulsos y empleada en el desacoplamiento heterocuclear de banda ancha.

¹⁸¹ Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9204-9217.

En este caso, dentro del tubo de RMN se coloca la acetofenona- β - ^{13}C **56** y acetonitrilo- d_3 como disolvente y dentro de la cánula del sistema de inyección se dispone el Tf_2O . Una vez ensamblado todo el sistema, tubo y cánula se introducen dentro del imán y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del Tf_2O . Cuando se habían adquirido dos experimentos, aproximadamente 20 segundos, se realizó la inyección. En total se registraron 500 espectros 2D UF-HSQC en un total de 85.35 min. Cada experimento UF-HSQC está adquirido con dos *scan*, lo que implica un tiempo total por experimento de 10.21 segundos. Los datos experimentales, así como los parámetros de adquisición optimizados para este experimento se han incluido en el apartado VI.5.1.

En la Figura 3.3 se muestran algunos espectros 2D UF-HSQC representativos de diferentes instantes de la reacción. En ellos se ha estudiado la ventana espectral alifática, comprendida entre 4.5 y 0.5 ppm en ^1H (dimensión directa) y desde 3.6 hasta 63.6 ppm en ^{13}C . La razón para ello es que en esta zona es donde mayores modificaciones se habían apreciado en el estudio preliminar mediante ^1H -RMN. Los espectros UF-HSQC de esa zona, deben proporcionar información acerca del número y tipo de nuevas especies generadas. Esto es, del número y tipo de nuevas correlaciones ^1H , ^{13}C en las que se ha transformado la correlación original ^1H , ^{13}C presente en el grupo metilo de la acetofenona.

En estos espectros registrados desde tiempo cero, se observa una señal de correlación a 26.9-2.57 ppm debida al grupo metilo de la acetofenona- β - ^{13}C **56** (marcada en **rojo**). Tras el comienzo de la reacción, su posición varía levemente, debido al cambio en la susceptibilidad magnética de la muestra. Su intensidad disminuye con el transcurso de la reacción. De manera adicional, tras los primeros instantes empiezan a aparecer paulatinamente cuatro nuevas señales de correlación (cuatro nuevos grupos metilo), en un entorno de 2 ppm en ^1H y de 10 ppm aproximadamente en ^{13}C , marcadas en negro.

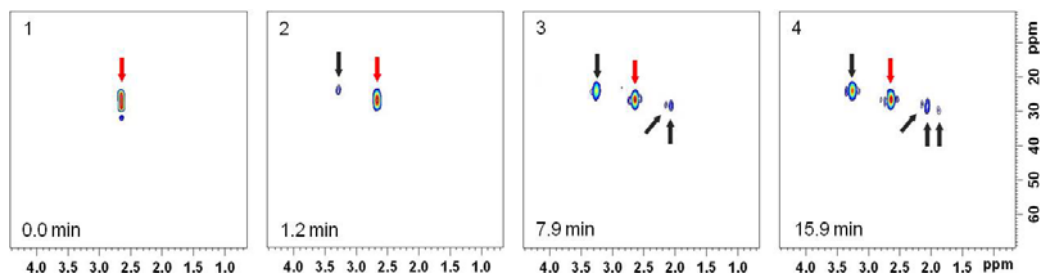


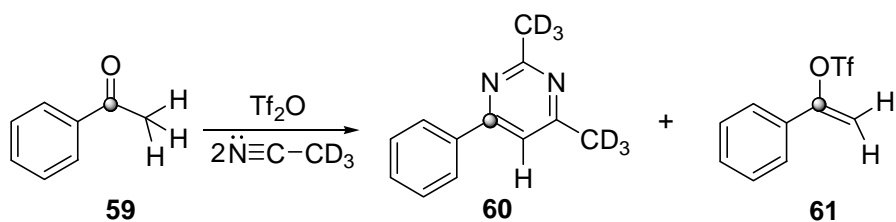
Figura 3.3. Espectros UF-HSQC representativos de la reacción de la acetofenona- β - ^{13}C **56** y Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-6- ^{13}C -fenilpirimidina- d_6 **57**

Ello muestra las excelentes características que ofrece la secuencia 2D UF-HSQC en la monitorización de este tipo de cambios estructurales. Sin embargo y solamente con estos datos, plantear hipótesis acerca de la naturaleza de las nuevas especies es discutible. Por ello, es necesario recurrir a completar estos resultados a través de los ofrecidos por la variante 2D UF-HMBC, marcando ahora al carbono carbonílico cetónico. Con ello se obtendrán datos directos acerca de la variación del entorno estructural del propio centro reactivo.

3.1.2. 2D UF-HMBC: reacción de acetofenona- α - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O)

La secuencia 2D UF-HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*) puede proporcionar una información directa y precisa acerca de los cambios que ocurren en el carbono carbonílico y los protones de las posiciones vecinas situadas a 2-3 enlaces ($^2J_{\text{C,H}}$, $^3J_{\text{C,H}}$) respecto de él. Esta información puede ser además de gran importancia, pues como es sabido, el grupo carbonilo juega un papel decisivo en numerosos procesos orgánicos.

Mediante los experimentos heteronucleares UF-HMBC, se monitorizará en tiempo real la evolución de la correlación del átomo de carbono carbonílico con los protones del grupo metilo de la acetofenona- α - ^{13}C **59** durante su reacción con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 , hasta que dicha señal se transforme en la correlación del carbono C6 con el protón pirimidínico del producto principal, la 2,4-dimetil-6- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 **60**. (Esquema 24)



Esquema 24

En la Figura 3.4 se representa el esquema del programa de pulsos empleado en el seguimiento de este sistema. Se trata de la misma secuencia 2D UF-HSQC modulada en amplitud, empleando un desacoplamiento de onda continua tipo WALTZ-16.¹⁸² La diferencia principal radica en el tiempo d , el cual se define igual 25 ms, para una $J=10$ Hz (valor promedio para $^2J_{\text{C,H}}$, $^3J_{\text{C,H}}$), propio de los experimentos HMBC.

Las señales de correlación pertenecientes a intermedios desconocidos en una reacción pueden aparecer en cualquier zona dentro de un amplio rango espectral. Por tanto existe la necesidad de trabajar con grandes rangos espectrales. Este requisito impone importantes exigencias en la intensidad de los gradientes empleados, lo que implica la adquisición de una gran cantidad de ruido dentro del espectro, haciendo que el experimento no sea viable. Además, como se ha mencionado en el apartado II.4.1, en la técnica de UF-NMR las anchuras espectrales de ambas dimensiones (SW_1 , SW_2) no son independientes entre ellas. Cuanto mayor es la anchura espectral requerida en ambas direcciones, peor es la resolución espectral de la dimensión codificada espacialmente. Incluso, tanto la anchura como la resolución espectral de esta misma dimensión dependen de la intensidad del gradiente de adquisición, G_a , y de su duración, T_a .

En el sistema reactivo estudiado, es previsible que tanto los desplazamientos químicos de las señales de los productos de partida y finales, como de los posibles intermedios requieran emplear un rango espectral amplio en la dimensión indirecta (la dimensión del ^{13}C). Este hecho se va a reflejar en una

¹⁸² WALTZ16 (Wideband Alternating-phase, Low-power Technique for Zero-residual splitting). Se trata de una secuencia empleada para el desacoplamiento heteronuclear de banda ancha.

disminución de la resolución espectral del experimento (ver apartado II.4). Por esta razón se decide monitorizar consecutivamente diferentes ventanas espectrales en la dimensión de ^{13}C (en este caso dos), lo que permitirá asimismo abarcar todo el dominio espectral necesario.

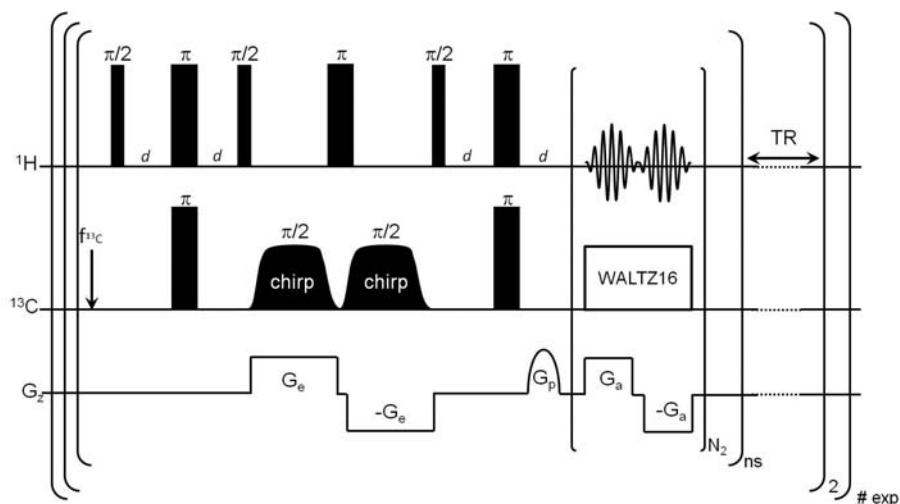


Figura 3.4. Esquema de la secuencia UF-HSQC de doble ventana dinámica empleada en la monitorización de sistemas dinámicos en tiempo real. El valor de la constante de acoplamiento se ajusta a 10 Hz y por tanto las correlaciones obtenidas serán ^1H , ^{13}C a larga distancia ($^2J_{\text{C,H}}/^3J_{\text{C,H}}$), obteniendo como resultado espectros UF-HMBC.

Una alternativa experimental podría consistir en la realización de experimentos independientes, lo que también significaría llevar a cabo reacciones distintas, con las consecuentes dificultades en la reproducibilidad de los mismos. Ello se debe fundamentalmente a que las reacciones dentro del tubo de RMN no ocurren siempre en las mismas condiciones debido a las características del sistema de inyección empleado.

Por esta razón, esta secuencia trabaja en modo dinámico, es decir que se repite secuencialmente a lo largo del seguimiento y permite la monitorización de dos ventanas espectrales diferentes en un mismo experimento. Ello se consigue, aplicando alternativamente la secuencia 2D UF-HMBC con diferente offset de la frecuencia en la dimensión indirecta (la dimensión del ^{13}C).

La reacción se realiza en el interior de un espectrómetro 500 MHz, equipado con una sonda de RF BBO a 298 K. Para la adición de los reactivos desde el exterior del equipo al interior del tubo de RMN se ha empleado el sistema de inyección descrito en el apartado VI.3.

En este caso, en el tubo de RMN se dispone la acetofenona- α - ^{13}C **59** y acetonitrilo- d_3 como disolvente y dentro de la cánula del sistema de inyección, el anhídrido tríflico. Una vez montado todo el sistema y ajustada la altura del tubo de resonancia, éste se introduce en el imán y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del Tf_2O . Cuando se habían adquirido dos experimentos, uno para cada ventana, aproximadamente 20 segundos después, se realizó la inyección. Se adquieren 219 espectros 2D UF-HMBC para cada ventana en un total de 112 min. Cada experimento UF-HMBC requiere 5.37 s y la medida se repite cada 10 s. Los datos experimentales, así como los parámetros de adquisición optimizados para este experimento se han incluido en el apartado VI.5.2.

Algunos de los espectros 2D UF-HMBC obtenidos en diferentes instantes de la reacción, correspondientes a las dos rangos espectrales estudiados se muestran en la Figura 3.5.

En la Figura 3.5a. se recogen los espectros pertenecientes al **rango espectral I**, el cual se extiende de 210 hasta 150 ppm en ^{13}C y de 9.0 hasta 2.0 ppm en ^1H (dimensión directa). Comprende, por tanto la región carbonílico-olefínica en ^{13}C . Al comienzo de la reacción (0.0 min) se observa exclusivamente una señal de correlación a 198.9-2.56 ppm debida al acoplamiento entre el carbono carbonílico y el grupo metilo de la acetofenona- α - ^{13}C **59** (marcada en rojo). Su intensidad irá disminuyendo de manera progresiva conforme aumenta el tiempo de reacción, hasta desaparecer por completo. A partir del minuto 1.53 se observa una señal de cruce a 8.38-167.4 ppm, la cual pertenece a la pirimidina final **60** (marcada en azul) y su intensidad aumenta con el tiempo (desde UF-HMBC número 3 hasta el 6). Estas correlaciones han sido confirmadas mediante experimentos tradicionales de RMN 1D y 2D.

Adicionalmente en esta primera ventana espectral, a 1.02 minutos después de la inyección (UF-HMBC 2), se observa una nueva correlación a 195.2-3.26 ppm (destacada en **verde**), muy próxima a la de la cetona inicial, lo que indica una cercanía estructural. Esta señal se intensifica y posteriormente decrece durante el transcurso de la reacción, hasta ser apenas perceptible, lo que refleja su carácter de intermedio.

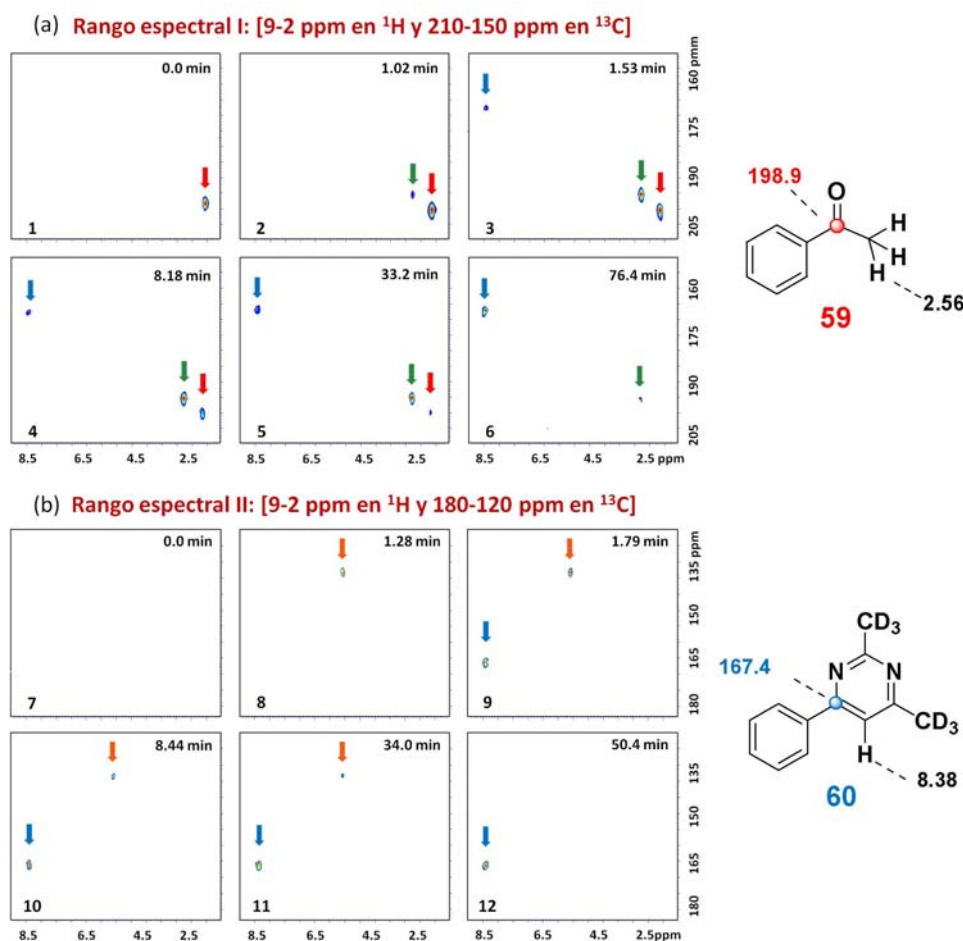


Figura 3.5. Espectros 2D UF-HMBC representativos de la reacción de la acetofenona- α - ^{13}C y Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-6- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 **59**. Se estudian dos ventanas espectrales diferentes, (a) la primera cubre el rango carbonílico y comprende desde 250 a 180 ppm en ^{13}C , (b) la segunda cubre el rango aromático-alifático desde 180 a 120 ppm en ^{13}C . Ambas coinciden de 9-2 ppm en ^1H . A la derecha de la figura se observan los desplazamientos químicos de los productos de partida y final.

En la Figura 3.5b. se muestran algunos espectros 2D UF-HMBC representativos del **rango espectral II** estudiado, el cual comprende de 180 hasta 120 ppm en ^{13}C , cubriendo con ello la zona olefínica-aromática y de 9.0 hasta 2.0 ppm en ^1H . Los espectros se encuentran numerados desde 7 hasta 12.

En esta ventana no se observa la señal de la acetofenona de partida, pues su señal de correlación queda fuera del rango estudiado, pero sí es evidente la presencia de pirimidina **60** desde el espectro 9, aumentando su intensidad hasta el final del seguimiento de la reacción. Las señales de cruce del triflato de α - ^{13}C -1-fenilvinilo **61** no se observan ya que se encuentran por debajo del límite de detección de la secuencia de pulsos empleada en el seguimiento. De hecho, en la monitorización de la reacción mediante espectros de ^1H -RMN, se observó la formación de una cantidad minoritaria de triflato de vinilo. La síntesis y caracterización de este compuesto se describen en el apartado VI.10.

En este mismo rango espectral, además de la señal de la pirimidina, que ya se esperaba, se observa una nueva señal de correlación a 138.3-5.56 ppm a partir del minuto 1.28 (marcada en **naranja**); esto es, aparece con posterioridad a la observación de la señal marcada en **verde** (Figura 3.5.a). Su intensidad tiene un comportamiento de crecimiento y caída a lo largo de la reacción, que evidencia su carácter de especie intermedia.

En nuestra opinión, la nueva señal de correlación del rango espectral I (destacada en **verde**) puede asignarse a la especie compleja **62** (Esquema 25), formada a partir de la acetofenona- α - ^{13}C y anhídrido trifílico. A favor de esta propuesta se encuentran los siguientes datos: su comportamiento como especie intermedia a lo largo de la reacción, el pequeño desplazamiento del carbono carbonílico¹⁸³ en comparación con el grupo carbonilo de la acetofenona- α - ^{13}C de partida y el desapantallamiento del grupo metilo vecino, así como la modelización mediante el programa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8. de la especie propuesta. Los datos obtenidos están en buena concordancia con los desplazamientos químicos observados para esta nueva correlación, lo que nos permite confirmar la hipótesis. Cabe destacar finalmente que es la primera vez que esta especie frecuentemente postulada en

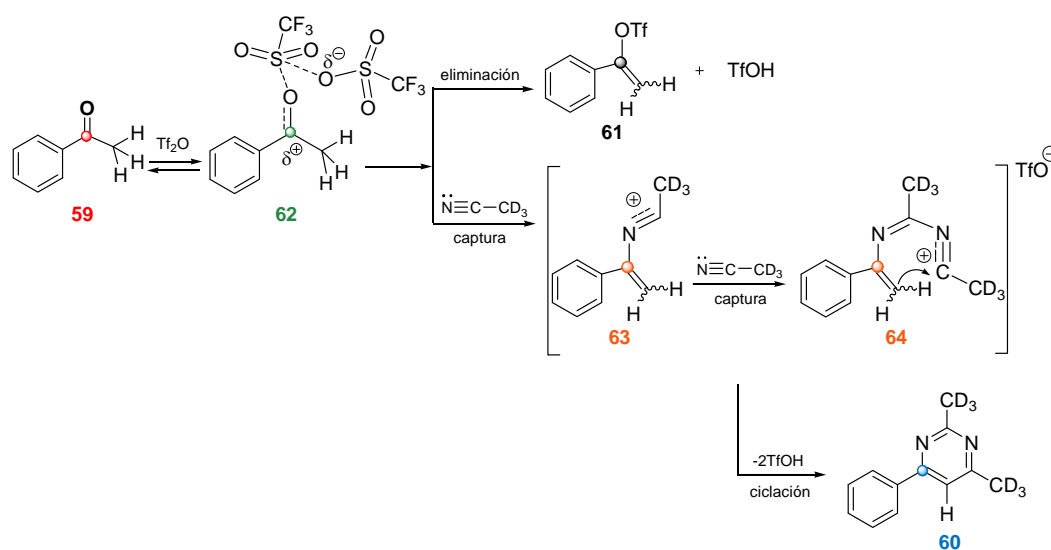
¹⁸³ Para los datos de ^{13}C de carbocationes: (a) Breitmeier, E.; Voelter, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, 3ra. Ed.; VCH: New York, 1987. (b) Stadler, D.; Goeppert, A.; Rasul, G.; Olah, G.A.; Prakash, S.; Bach, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 312-318.

los mecanismos para este tipo de reacciones, es detectada espectroscópicamente.

Otros cationes bencílicos similares a **62** muestran largos tiempos de vida, debido a que el anillo aromático estabiliza la carga positiva formada en el carbono carbonílico. Por otro lado, estas especies han sido generadas térmicamente, pudiendo ser atrapadas en disolventes orgánicos como el acetonitrilo.¹⁸⁴

Finalmente, las nuevas señales de cruce observadas en el rango espectral II, han sido asignadas a la correlación $\text{C}=\text{CH}_2$ de la mezcla de sales de nitrilo olefínicas **63/64** (Esquema 25). Una vez más la modelización realizada mediante el programa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8.00 está en acuerdo con los desplazamientos químicos observados.

El esquema que seguidamente se muestra describe el mecanismo propuesto para la reacción estudiada, en concordancia con las nuevas señales espectrales observadas durante el seguimiento.



Esquema 25

¹⁸⁴ (a) Darbeau, R.W.; Gible, R.E.; Pease, R.S.; Bridges, D.E.; Siso, L.M.; Heurtin, D.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **2001**, 1084-1090. (b) White, E.H.; DePinto, J.T.; Polito, A.J.; Bauer, I.; Roswell, D.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 3708-3709.

La reacción comienza con el ataque nucleófilo del oxígeno carbonílico sobre el átomo de azufre del Tf_2O , que da lugar a la formación del intermedio **62**. Afortunadamente su estabilidad es lo suficientemente alta como para poder ser detectado con anterioridad a su captura nucleófila, la cual conduce a la mezcla de intermedios olefínicos **63/64** correspondientes a las dos posibles capturas. La ciclación y evolución final de **64** llevan finalmente a la pirimidina **60**.

A través de esta monitorización dinámica por medio de 2D UF-HMBC, también es posible obtener datos cinéticos de las especies participantes. Así en la Figura 3.6 se muestra la variación de la intensidad de las señales de las especies participantes detectadas a lo largo de la reacción estudiada. Para ello, las señales se han integrado empleando un programa de cálculo desarrollado en nuestro grupo de trabajo basado en lenguaje Matlab 7.11. El programa procesa los espectros para cada uno de los experimentos empleando los mismos parámetros para todos ellos. En este caso en particular, los espectros corresponden a la suma de los datos adquiridos durante los gradientes tanto positivo como negativo. A partir del ajuste de estas curvas a la ecuación $I(\tau) = I_0 e^{(-\tau/t_{1/2})} + I_\infty$ es posible calcular el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las especies que se muestran en la Figura 3.6.

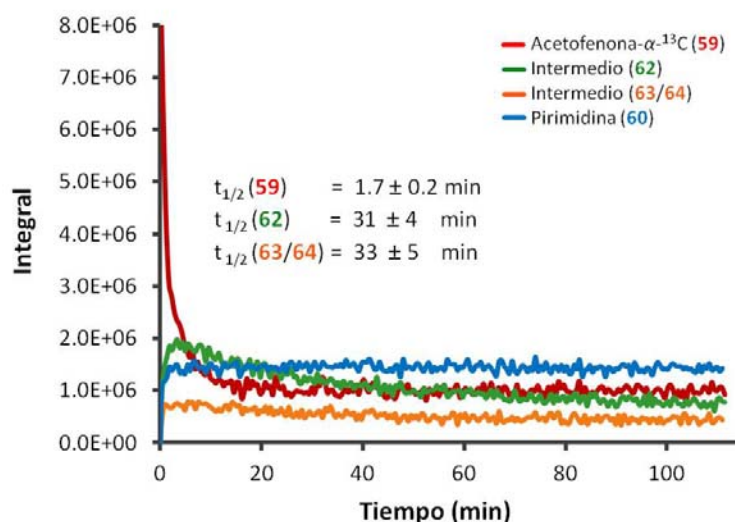


Figura 3.6. Integrales promedio de las señales de correlación de las especies detectadas como función del tiempo. En ellas es posible observar los tiempos de vida media para la acetofenona- $\alpha\text{-}^{13}\text{C}$ (**59**) y los intermedios (**62** y **63/64**).

Estos resultados muestran las excelentes características de la secuencia UF-HMBC como técnica para la monitorización dinámica. Un inconveniente se deriva sin embargo de la necesidad de utilizar productos marcados debido a la baja intensidad de las señales de correlación HMBC.

Con los 219 espectros 2D UF-HMBC obtenidos para cada una de las ventanas espectrales, se ha realizado una animación la cual se encuentra adjunta en el CD de esta memoria. Estos resultados han sido publicados en *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 144-147.

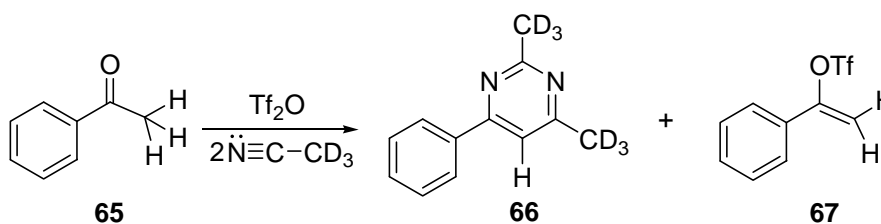
Tras el análisis de las posibilidades de monitorización dinámica mediante las técnicas 2D UF-HSQC y UF-HSQC, quedan una serie de aspectos experimentales y mecanísticos pendientes de ampliación y optimización. En primer lugar, si bien la monitorización mediante 2D UF-HSQC estándar empleando producto de partida marcado permitió la detección de nuevas especies en la zona alifática, no es menos cierto que resulta necesario mejorar su baja relación S/R. También es imprescindible estudiar simultáneamente al menos dos zonas espectrales, como se ha llevado a cabo con la técnica 2D UF-HMBC y, por supuesto, sería importante poder suprimir el marcaje isotópico y trabajar con productos con abundancia natural. Por todo ello se abordó el estudio de la monitorización mediante 2D UF-HSQC selectivo.

3.2. 2D UF-HSQC Selectivo: Aplicación a la reacción de acetofenona y anhídrido trifílico (Tf₂O) sin marcaje isotópico

Es evidente que el seguimiento de reacciones en tiempo real mediante la metodología de UF-NMR requiere el empleo de altas concentraciones y/o moléculas marcadas isotópicamente, con el fin de incrementar la intensidad de las señales de correlación de las posibles especies que se desean detectar. Los intentos realizados hasta este momento aplicando las secuencias heteronucleares de UF-NMR estándar para obtener información con acetofenona sin marcaje isotópico no ha tenido éxito.

Por otro lado, cuando se requiere estudiar amplios rangos espectrales, el trabajo se sitúa en el límite de exigencia del hardware del equipo. Ello conduce a la introducción de una gran cantidad de ruido dentro del espectro y a que el experimento no sea viable. Todo esto ha contribuido a que esta metodología no haya tenido una aplicación más generalizada.

Teniendo en cuenta estas dificultades y en colaboración con el grupo del Prof. Lucio Frydman en el Instituto Weizman en Rehovot (Israel), se ha desarrollado una nueva secuencia ultrarrápida, denominada 2D UF-HSQC Selectivo, la cual consiste básicamente en un UF-HSQC combinado con un bloque INEPT de pulsos selectivos. Esta secuencia permite trabajar con pequeñas ventanas espectrales lo que maximiza la sensibilidad del experimento y presenta adicionalmente la ventaja de que no requiere grandes intensidades para el gradiente de adquisición. Todo esto con el objetivo principal de lograr realizar el seguimiento de una reacción con reactivos con **abundancia natural**.



Esquema 26

Como resultado del seguimiento de la reacción desde tiempo cero mediante espectroscopía de ^1H -RMN (Figura 3.1, apartado 3.1), se vió la necesidad de seleccionar tres rangos espectrales distintos en los que habría que aplicar los experimentos de 2D UF-HSQC Selectivos. Cada una de estas ventanas poseen aproximadamente 1.33 ppm en el rango del ^1H y 10.0 ppm para la dimensión del ^{13}C . Se trata pues de rangos muy estrechos. Ellos comprenden (i) la *región alifática* en la que se observa la acetofenona inicial, que abarca de 1.54-2.87 ppm en ^1H y de 23.7-33.7 ppm en ^{13}C , (ii) la *región olefínica*, desde 5.17 a 6.50 ppm en ^1H y de 106.0 a 116.0 en ppm ^{13}C y (iii) la *región aromática*, en la cual se observa la pirimidina final, cubriendo un rango de 7.49-8.81 ppm en ^1H y 112.40-122.40 ppm en ^{13}C .

La reacción se realiza en el interior de un espectrómetro Varian VNMRS de 600 MHz, equipado con una sonda de triple canal HCN a 298 K. Para la adición de los reactivos desde el exterior del imán al interior del tubo de RMN, se ha empleado el sistema de inyección descrito en el apartado VI.3.

En este caso, dentro del tubo de RMN se disponen la acetofenona **65** y acetonitrilo- d_3 como disolvente y dentro de la cánula del sistema de inyección, el Tf_2O . Una vez ensamblado todo el sistema, tubo y cánula se introducen en el equipo y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del Tf_2O . En total se adquirieron 500 espectros 2D UF-HSQC Selectivos, empleando 12 *scans* para cada ventana espectral, en un tiempo total de 432.6 min. Cada espectro 2D UF-HSQC Selectivo requiere 4.16 s por *scan* para ser adquirido, lo que supone un tiempo total por experimento de 49.9 s,

repitiéndose la medida cada 2 s (TR). Los datos experimentales y los parámetros de adquisición optimizados para este experimento se han incluido en el apartado VI.5.3.

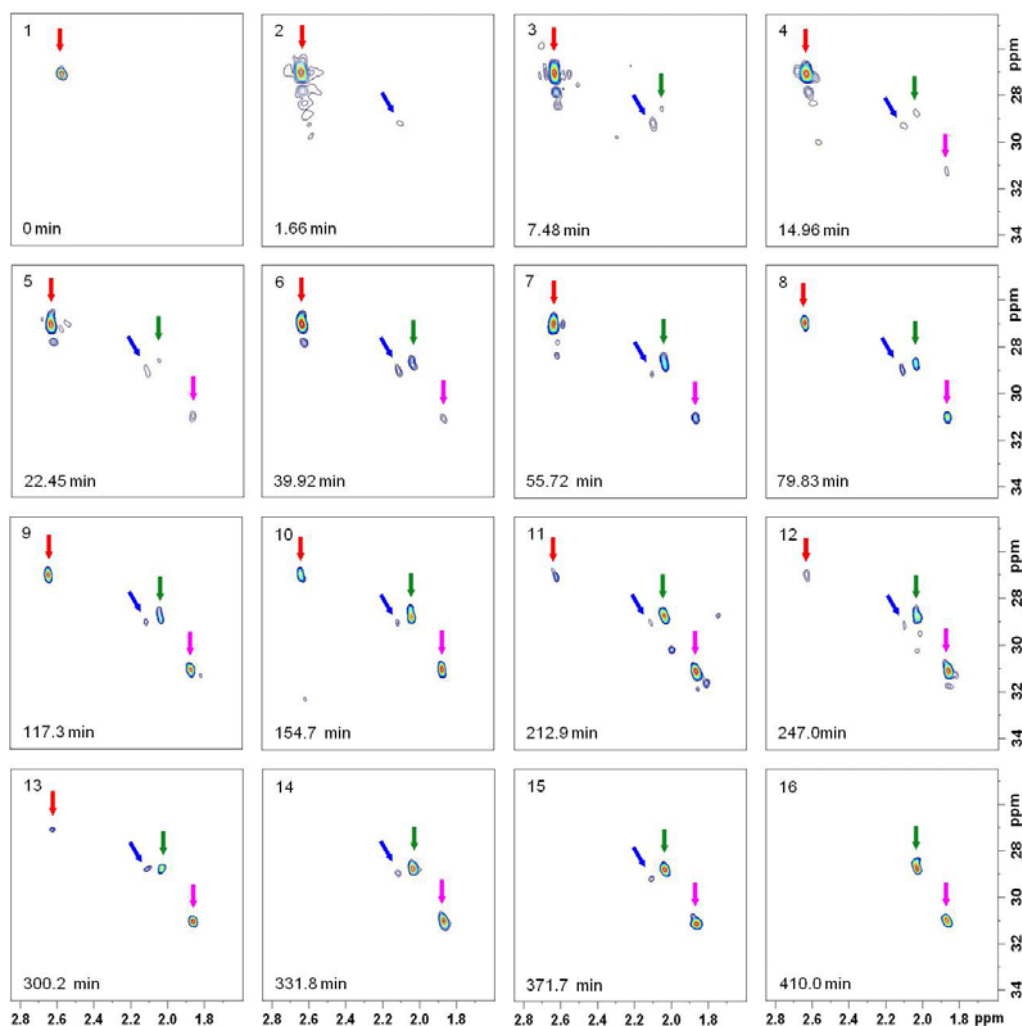


Figura 3.8. Selección de espectros 2D UF-HSQC Selectivos del *rango alifático* para el seguimiento de la reacción de acetofenona **65** en *abundancia natural*, con anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 , para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 **66**.

En la Figura 3.8 se observan algunos espectros 2D UF-HSQC Selectivos adquiridos para la *región espectral alifática*. En ellos se marcan con flechas de colores las señales de correlación de la cetona de partida **65** (flechas **rojas**), confirmadas

mediante espectros tradicionales de RMN 1D y 2D, y de nuevas especies intermedias participantes en la reacción (flechas **azul**, **verde** y **rosa**).

En esta ventana alifática, de manera anterior a la inyección (0 minutos) de reactivos, es posible observar la señal de correlación del metilo de la acetofenona en acetonitrilo- d_3 , (flecha **roja**). Después de haber iniciado la reacción, en el minuto 1.66, se observa una nueva señal de correlación a 2.09/28.40 ppm (flecha **azul**). Posteriormente a 7.48 y 14.97 minutos aparecen dos señales adicionales a 2.02/28.10 ppm (flecha **verde**) y 1.82/30.30 ppm (flecha **rosa**) respectivamente, que son detectadas con claridad. La intensidad de estas señales de correlación varía con el tiempo, creciendo y decreciendo durante el curso de la reacción, lo que indica su pertenencia a especies con carácter intermediario.

En la Figura 3.9 se observan algunos espectros 2D UF-HSQC Selectivos representativos para la región aromática. Estos se encuentran dominados por la presencia de una única señal de correlación (flechas **azul claro**) a 8.33/119.0 ppm, la cual corresponde al enlace H5-C5 de la pirimidina final **66** (confirmado por espectros 1D y 2D de RMN tradicional). Esta aparece 1.66 minutos después de haber iniciado la reacción y muestra una intensidad de señal en aumento a medida que avanza el proceso, como es de esperar.

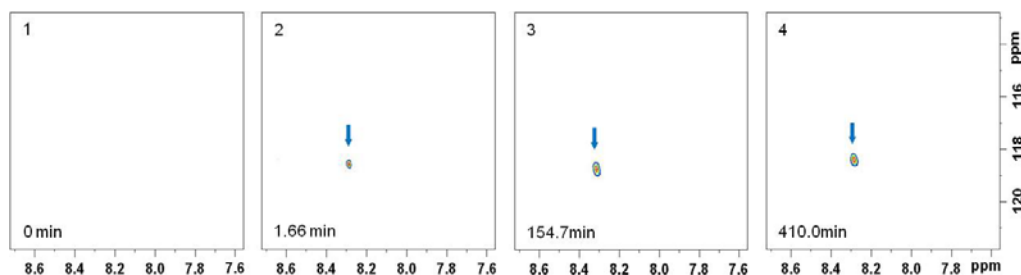


Figura 3.9. Selección de espectros 2D UF-HSQC Selectivos del *rango aromático* para el seguimiento de la reacción de acetofenona **65** en *abundancia natural*, con anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 , para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 **66**.

De igual manera se han adquirido espectros 2D UF-HSQC Selectivos para la región espectral olefínica; sin embargo en ellos no ha sido posible observar las correlaciones propias del triflato de 1-fenilvinilo **67**, ni señal alguna que evidencie la presencia de especies olefínicas intermedias, tal y como predecían

los estudios mediante espectroscopía de RMN de ^1H y 2D UF-HMBC. Por esta razón se repitió el experimento 2D UF-HSQC Selectivo, pero empleando la reacción de la acetofenona- β - ^{13}C **56** como reactivo (Esquema 23). Un rango espectral desde 5.17-6.50 ppm en ^1H y de 102.6-119.2 ppm en ^{13}C permite observar los productos olefínicos y los intermedios presentes en esta zona del espectro.

En total se adquirieron 1200 espectros 2D UF-HSQC Selectivos para esta zona olefínica, con 2 *scans* cada una, en un tiempo total de 246.5 min. Cada experimento requiere 4.16 s por *scan*, pues se emplea la misma secuencia de pulsos, pero que en esta ocasión conlleva un tiempo total de 8.32 s por experimento. La medida se repite cada 3 s. Los datos experimentales y los parámetros de adquisición optimizados se han incluido en el apartado VI.5.4.

En la Figura 3.10 se observan algunos espectros representativos de este experimento. Como era de esperar, después de 0.62 minutos de haber realizado la inyección, es posible visualizar una pareja de señales de correlación, provenientes del triflato de β - ^{13}C -1-fenilvinilo **58** (flechas **purpura**), confirmadas a través de los espectros tradicionales de RMN 1D y 2D. La duplicidad de las señales, se debe a la naturaleza diastereotópica de los protones del grupo CH_2 . De manera adicional, a 0.82 min de haber iniciado el proceso, se observa la aparición una nueva pareja de correlaciones olefínicas (flechas **amarillo oscuro**), las cuales crecen y decrecen durante el transcurso de la reacción, mostrando con ello su carácter de especie intermedia.

Hasta el momento no se ha encontrado una explicación razonable para la señal de correlación detectada a 6.20/106.5 ppm, la cual no ha sido observada en las pruebas realizadas en el laboratorio para esta reacción y por tanto podría ser considerada como un artefacto del experimento.

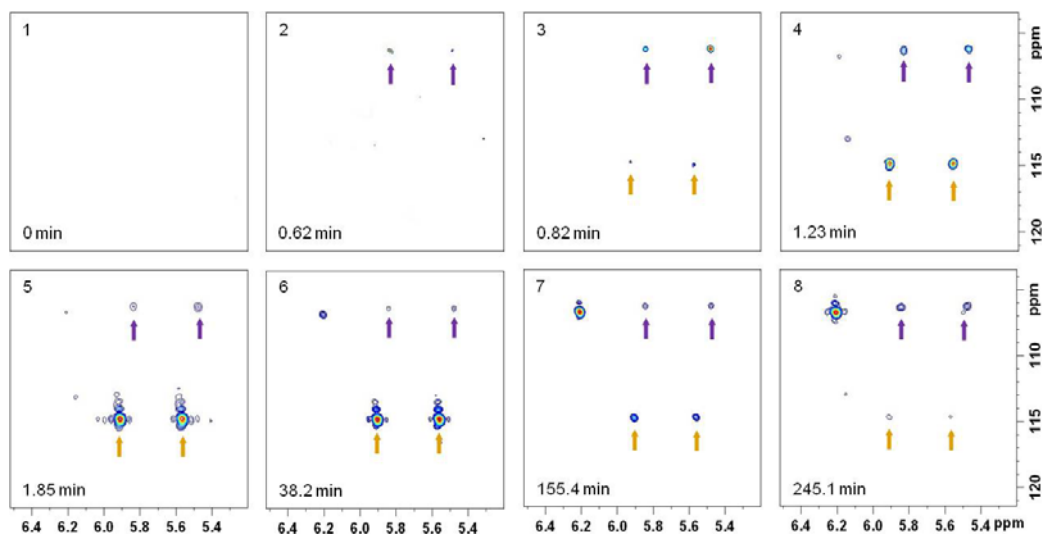


Figura 3.10. Selección de espectros 2D UF-HSQC Selectivos del *rango olefínico* para el seguimiento de la reacción de acetofenona- β - ^{13}C **56**, con anhídrido triflico ($\text{ Tf}_2\text{O}$) en presencia de acetonitrilo- d_3 . Esta prueba se realiza con el fin de estudiar la región olefínica del espectro.

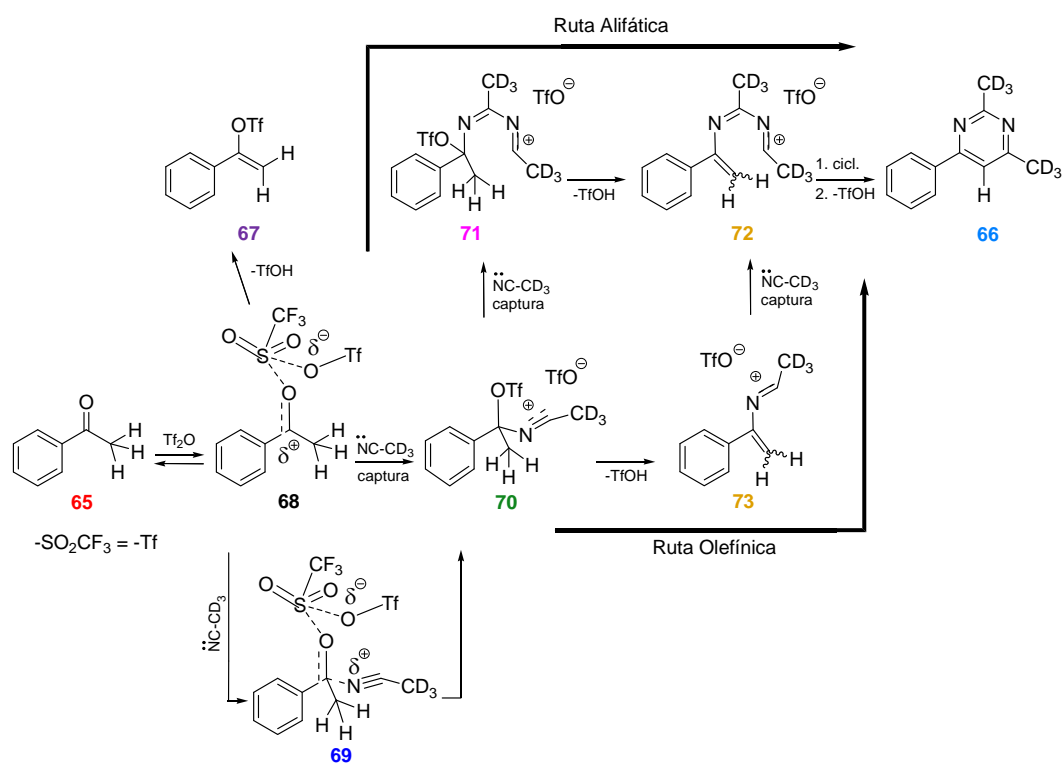
A partir de todos estos resultados obtenidos mediante la secuencia 2D UF-HSQC Selectiva se completan satisfactoriamente los resultados parciales anteriormente obtenidos mediante 2D UF-HSQC y UF-HMBC. De esta forma, es posible formular un mecanismo, mostrado en el Esquema 27, capaz de racionalizar todas las señales de correlación observadas y los resultados obtenidos para esta reacción con las diferentes secuencias heteronucleares empleadas.

Los espectros adquiridos para la región alifática revelan que la reacción tiene comienzo a través de un ataque nucleófilo del oxígeno carbonílico de la acetofenona sobre el átomo de azufre del $\text{ Tf}_2\text{O}$, dando lugar a la formación del intermedio **68**, que si bien con la secuencia 2D UF-HSQC Selectiva su señal de correlación quedaba fuera del rango estudiado, ha sido detectado mediante correlaciones a $^2J_{\text{C,H}}$ en el estudio con 2D UF-HMBC de la reacción con acetofenona- α - ^{13}C (apartado 3.1.2).¹⁸⁵

En la evolución de **68** caben dos alternativas: por un lado la captura nucleófila por parte de una molécula de acetonitrilo- d_3 , que permite la formación de la

¹⁸⁵ Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Gutiérrez, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z.D.; Sáez, E. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 144-147.

especie compleja **69**, que evoluciona hacia la sal de nitrilo intermedia **70**.^{186,187} En la evolución de esta última especie puede tener lugar una captura adicional de acetonitrilo- d_3 , que da paso a la formación de la especie **71**. Estos resultados son la confirmación de los estudios preliminares realizados con la secuencia 2D UF-HSQC y la acetofenona- β - ^{13}C , mostrados en el apartado 3.1.1. Dicho seguimiento permitió estudiar una ventana espectral más amplia (4.50-0.50 ppm en ^1H ; 63.6-3.6 ppm en ^{13}C) y en ella se observó la formación del intermedio **68** y su evolución a los intermedios **69-71** (Figura 3.3).



Esquema 27

La segunda posibilidad de evolución del intermedio **68** consiste en la eliminación de ácido trifluoromético, dando lugar a la formación del triflato de 1-fenilvinilo **67** como producto secundario. Como ya se ha mencionado, las correlaciones provenientes

¹⁸⁶ Kanemasa, S. In *Science of Synthesis*; Murahashi, S., Ed.; Thieme: Stuttgart, 2001; Vol 19, pp 53-65.

¹⁸⁷ (a) Darbeau, R.W.; Gible, R.E.; Pease, R.S.; Bridges, D.E.; Siso, L.M.; Heurtin, D.J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, **2001**, 1084-1090. (b) White, E.H.; DePinto, J.T.; Polito, A.J.; Bauer, I.; Roswell, D.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3708-3709.

de este subproducto y de los posibles intermedios olefínicos **72/73** no han sido observadas en el estudio con acetofenona no marcada isotópicamente, aunque sí con la cetona marcada. Aún así, algún intermedio olefínico debe de participar en el proceso¹⁸⁸ por eliminación de ácido tríflico de la especie **71**, lo que conducirá a la formación del doble enlace C=C presente en **72**. De no ser así, no podría ocurrir la ciclación que lleva a la formación del anillo de la pirimidina final.

Creemos que la razón de que estas especies no hayan sido observadas es que tanto su concentración, como el hecho de que existan en abundancia natural, hacen que se encuentren por debajo de los límites de detección de la secuencia. Al repetir el experimento con acetofenona- β -¹³C, sí ha sido posible observar la doble señal de correlación H,C procedente del grupo metilideno del triflato de 1-fenilvinilo **67**. Adicionalmente se observa la aparición de un nuevo par de señales de correlación olefínicas que provienen de intermedios de reacción (Figura 3.10), que muestran igualmente un patrón de protones diasterotópicos.

Se ha atribuido el origen de estas señales a las sales olefínicas intermedias **72** y **73**, las cuales contienen dos y una molécula de acetonitrilo-*d*₃, respectivamente. La formación de **73** tendría lugar por la eliminación de ácido tríflico del intermedio **70**, de manera previa a la segunda captura nucleófila de acetonitrilo-*d*₃, que origina finalmente el intermedio **72**.

Estos resultados en conjunto permiten proponer dos rutas mecanísticas a través de las cuales puede transcurrir esta reacción, denominadas **ruta alifática** y **ruta olefínica**. De esta forma, el intermedio **71**, sería el primer paso de la **ruta alifática**, mientras que el intermedio **73** sería la primera especie de la **ruta olefínica**. Las sales intermedias **70** inicial y **72** final, serían comunes a las dos rutas. El progreso de la reacción a través de una u otra ruta y la velocidad relativa de ambas vías dependerá en gran medida de la estabilidad del intermedio **70**.

Con el fin de obtener un respaldo estructural adicional acerca de la naturaleza de los intermedios detectados, hemos comparado los desplazamientos químicos observados en los experimentos de UF-NMR con los datos obtenidos mediante modelización de las diversas estructuras postuladas como participantes en el mecanismo de reacción propuesto en el Esquema 27 (ver Tabla 3.1).

¹⁸⁸ Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Chioua, M.; Chioua, R.; Sánchez, Á. *Tetrahedron* **2002**, 58, 10053-10058.

Tabla 3.1. Desplazamientos químicos observados y calculados para las diferentes especies involucradas en el mecanismo propuesto de reacción.

Intermedios	δ Observados (CD ₃ CN) ^a		δ Calculados (CDCl ₃) ^b	δ Calculados GAUSSIAN 09 ^d
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
65	2.64	26.33	2.60	24,70 ^f
		196.90		193.05 ^f (216.00 ^e)
68	3.26	23.71		28.75 ^e
		195.2		202.40 ^e
66 ^{a,c}	8.33	119.01	6.85	123.02 ^e
67	5.85	105.76	5.94	103.20 ^f (118.60 ^e)
	5.49		4.50	
69	2.09	28.40		31.21 ^e
70	2.01	28.05	1.64	33.60 ^e
71	1.84	30.26	2.04	33.30 ^e
72	5.89	114.50	5.08	110.70 ^e
	5.54		4.97	
73	5.89	114.50	5.15	146.60 ^e
	5.54		4.99	

a) Ver apartado IV.5.3; **b)** Valores obtenidos con ACD/Labs (V 8.00); **c)** Las diferencias entre los valores observados y los calculados son debidas a la naturaleza del disolvente; **d)** Calculada teniendo en cuenta TMS ($\delta^{13}\text{C}$ = valor δ del TMS de Gaussian09 – valor de $\delta^{13}\text{C}$ del compuesto según Gaussian09); **e)** Calculado con la aproximación M062X; **f)** Calculado con la aproximación B3LYP.

Para las estimaciones de los desplazamientos químicos en ^1H -RMN fue empleado el programa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8.00. Los cálculos de desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN se realizaron mediante la modelización con un conjunto de programas Gaussian 09¹⁸⁹ utilizando el método GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G*.¹⁹⁰

En todos los casos hemos encontrado una buena concordancia entre los valores observados y los calculados para las estructuras postuladas. Adicionalmente, estos cálculos han permitido proponer una estructura definida para los intermedios **72/73**, mostrando con claridad que la sal intermedia olefínica detectada corresponde a la estructura propuesta para el intermedio final **72**.

La representación de la variación de la intensidad de las diferentes señales de correlación encontradas en las ventanas espectrales estudiadas a lo largo del proceso, empleando reactivos con y sin marcaje isotópico, proporciona valiosos datos cinéticos, tal como se muestra en la Figura 3.11. A la izquierda se representa el comportamiento cinético de la acetofenona **65** y de las especies intermedias **69**, **70**, **71** presentes en la ventana alifática. A la derecha se observa la evolución en la ventana aromática, que refleja la formación de la pirimidina final **66**. En la parte inferior de la figura, se observa el comportamiento cinético de la especie intermedia olefínica **72**, que revela su rápida formación, su coexistencia a lo largo del proceso y finalmente su caída. Además, se observa la formación del triflato de 1-fenilvinilo **67** como subproducto.

¹⁸⁹ Frisch, M. J. et al. Gaussian 09, revision B.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.

¹⁹⁰ Los desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN han sido calculados con el conjunto de programas Gaussian 09 utilizando la aproximación GIAO, el funcional metahíbrido M06-2X y las funciones de base de calidad doble-zeta 6-31+G*. Los efectos del disolvente (acetonitrilo) se han modelizado empleando el método PCM (Polarizable Continuum Model). Este método se denomina GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G* (ver apartado II.7).

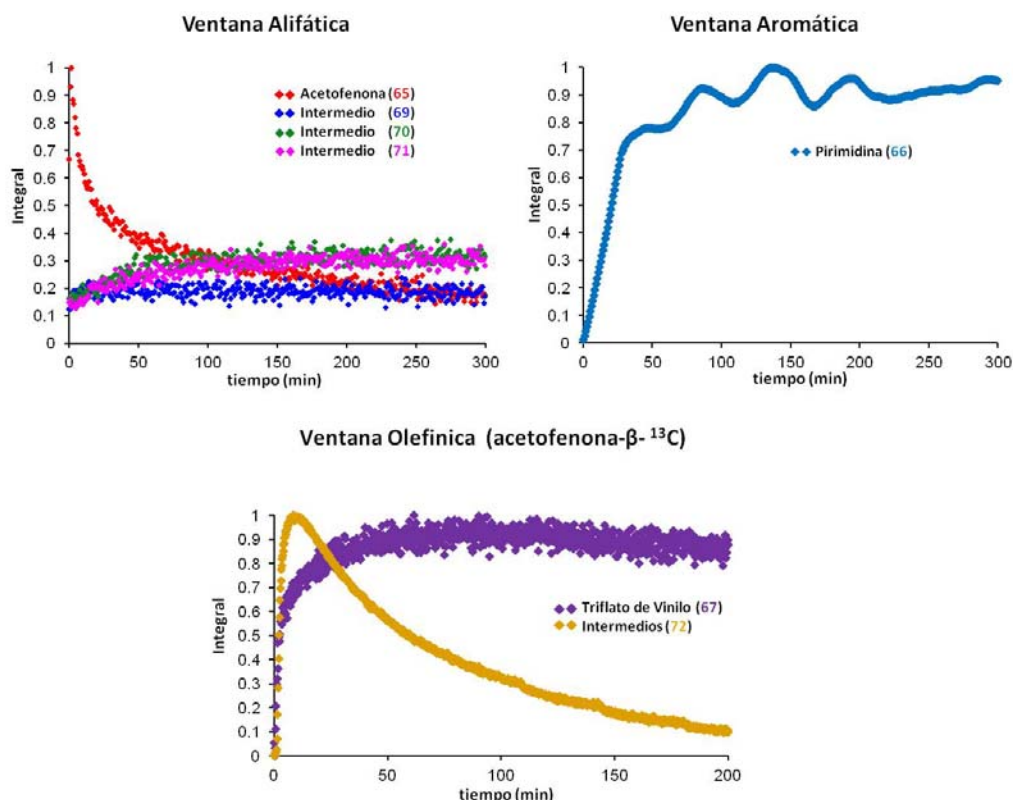


Figura 3.11. Integrales promedio de las señales de correlación de las especies detectadas en (izquierda) la ventana alifática, que son la acetofenona **65** y los intermedios **69**, **70** y **71**; (derecha) la ventana aromática, que es la pirimidina **66** y (parte inferior) la ventana olefínica para la reacción con acetofenona-β-¹³C, en la que se observa el 1-fenilviniltriflato **67** y la sal intermedia olefínica **72**, todas ellas en función del tiempo.

Para obtener el valor de la integral de las señales se ha empleado un programa de cálculo desarrollado por nuestro grupo y basado en lenguaje Matlab 7.11. Este programa procesa los espectros de cada uno de los experimentos empleando los mismos parámetros para todos ellos. En este caso en particular, los espectros corresponden a la suma de los datos adquiridos durante los gradientes tanto positivos como negativos.

Con el programa de procesamiento desarrollado por nuestro grupo (**XprocUFnmr**), también es posible representar los espectros adquiridos en diagramas en 3D, como el que se muestra en la Figura 3.12. A partir de ellos se han construido animaciones para cada una de las ventanas espectrales, adjuntas en el CD de

esta memoria. Estos resultados han sido publicados en el *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 2706-2715.

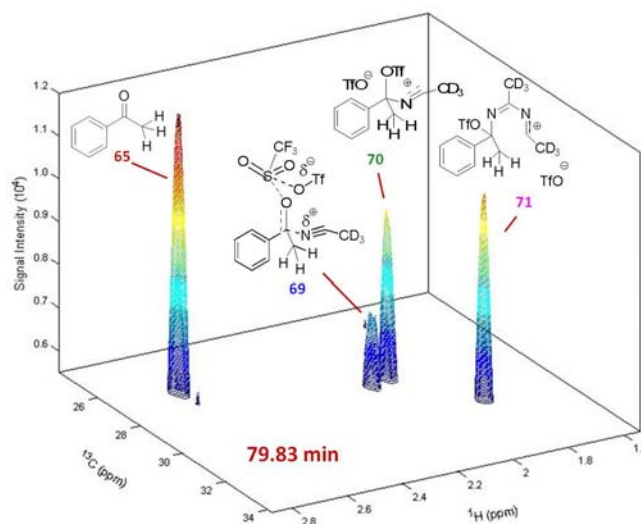


Figura 3.12. Representación 3D del espectro 2D UF-HSQC Selectivo del *rango alifático* [1.54-2.87 ppm en ^1H y 23.7-33.7 ppm en ^{13}C] a 79.83 minutos, para el seguimiento de la reacción de acetofenona **65** en *abundancia natural*, con anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 .

En resumen, en el Capítulo 3 se ha abordado la utilización de secuencias de correlación heteronucleares 2D UF-HSQC, UF-HMBC moduladas en amplitud y desarrolladas con anterioridad en nuestro grupo de trabajo, así como la secuencia también de correlación heteronuclear UF-HSQC Selectivo, desarrollada en colaboración con el grupo del Prof. Lucio Frydman. Se han aplicado respectivamente al estudio en tiempo real de la reacción de la acetofenona marcada isotópicamente con ^{13}C , en posiciones α y β y en abundancia natural, con anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 . Destacan los siguientes aspectos:

- Se han optimizado los parámetros de adquisición para todas las secuencias empleadas, con objeto de obtener una relación S/R y una resolución óptimas en el seguimiento de la reacción en tiempo real.
- Mediante la secuencia 2D UF-HSQC estándar, se ha realizado la monitorización de la reacción de la acetofenona- β - ^{13}C , que da lugar a la

2,4-dimetil-5- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 . Se han registrado 500 espectros en un tiempo de 85.35 min. A través de la secuencia 2D UF-HMBC de doble ventana, se ha estudiado la reacción con la acetofenona- α - ^{13}C , que conduce a la 2,4-dimetil-6- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 como producto principal. En este caso se han obtenido 219 espectros por cada ventana espectral estudiada, en un tiempo de 112 min.

- La monitorización de la reacción de la acetofenona en condiciones de abundancia natural, que da lugar a 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 como producto principal, se ha realizado en un equipo de RMN Varian, de 600 MHz. Se han registrado 500 espectros 2D UF-HSQC Selectivos con 12 *scans* por cada ventana espectral estudiada, en un tiempo total de 432.6 min.
- La secuencia 2D UF-HMBC de doble ventana ha permitido encontrar información directa acerca de los cambios que tienen lugar en el propio núcleo del carbono carbonílico de la acetofenona de partida. De esta forma, se ha obtenido de manera novedosa evidencia espectroscópica de la especie compleja **62**, consistente en un catión trifiloxicarbenio estabilizado con un contraión triflato. Este intermedio ha sido propuesto en numerosas ocasiones en los mecanismos planteados para dar explicación a este tipo de reacciones, sin que hasta ahora se dispusiera de evidencias reales de su existencia.
- Igualmente se han detectado por primera vez, señales de correlación de las especies intermedias olefínicas **63/64**, que son participantes importantes en el mecanismo de esta reacción.
- La secuencia 2D UF-HSQC Selectiva ha mostrado por primera vez la presencia de los intermedios alifáticos **69**, **70** y **71** en condiciones de abundancia natural y la especie olefínica **72**. Ello confirma los resultados previos realizados con los estudios mediante 2D UF-HMBC para la acetofenona- α - ^{13}C (apartado 3.1.2).¹⁹¹
- Se ha confirmado la asignación estructural de todas las especies detectadas mediante las diferentes secuencias de UF-NMR de correlación

¹⁹¹ Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Gutiérrez, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z.D.; Sáez, E. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 144-147.

heteronuclear, empleando el programa de modelización Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8 y mediante cálculos más complejos realizados con un conjunto de programas Gaussian 09 y el método GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G*. Los valores de los desplazamientos químicos observados se encuentran en muy buena concordancia con los valores calculados.

- Ha sido posible obtener datos cinéticos a partir de los diferentes procesos estudiados, lo que aporta una información valiosa relativa a la concentración de las especies participantes en la reacción.
- Los datos obtenidos han permitido establecer de manera clara dos vías mecanísticas, a través de las cuales esta reacción tiene lugar, denominadas respectivamente **ruta alifática** y **ruta olefínica**. Los resultados muestran la idoneidad de la técnica UF-NMR de acoplamiento heteronuclear como método para el seguimiento de reacciones orgánicas en tiempo real y el estudio de los mecanismos de reacción implicados.

Capítulo 4: Aplicación de secuencias de UF-NMR 2D combinadas

Como ha quedado de manifiesto en los dos capítulos anteriores, la metodología de UF-NMR puede aplicarse satisfactoriamente en el seguimiento dinámico de una reacción en tiempo real, mediante la utilización de secuencias de correlación escalar homo (2D UF-TOCSY) y heteronucleares (2D UF-HSQC, UF-HMBC). La implementación de estas secuencias va a depender de las características concretas del sistema a estudiar. Por ello, dependiendo de cuál sea el cambio estructural producido, emplear una u otra estrategia resultará más adecuado. A pesar de ello, todavía siguen quedando preguntas que estas secuencias no son capaces de responder de forma individual.

Un estudio combinado de las correlaciones escalares, homo y heteronucleares, $^nJ_{H,H}$ y $^nJ_{C,H}$, debe proporcionar sin duda una herramienta importante en la caracterización estructural de moléculas en solución de tamaño pequeño y mediano. Una prueba de ello son las diferentes versiones descritas de experimentos de dos pasos, en los que una secuencia heteronuclear es seguida por una transferencia tipo TOCSY. Así, se encuentran α/β -HSQC-TOCSY,¹⁹² selHSQMBC-TOCSY,¹⁹³ selHSQMBC-COSY¹⁹⁴ y otras, que permiten obtener información de las correlaciones heteronucleares entre protones y carbonos que pertenecen al mismo sistema de espines, bien para carbonos protonados o no.

Por todo ello, la aplicación de una secuencia de UF-NMR que comprenda tanto el estudio homo como heteronuclear para la monitorización de procesos dinámicos, proporcionará sin duda una información más completa sobre la evolución de las reacciones orgánicas y en concreto acerca de los posibles intermedios y productos formados durante la misma. Esto se abordará en el presente capítulo.

4.1. Secuencia en tándem homo-heteronuclear 2D UF-TOCSY-HMBC: Estudio mecanístico de la reacción de la ciclohexanona- α - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3

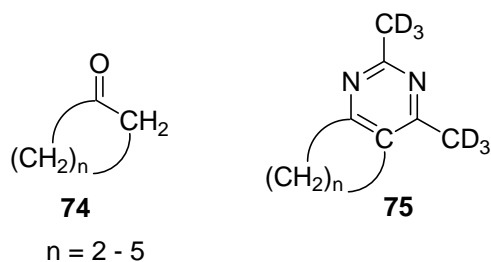
En los capítulos 2 y 3 se recoge la información obtenida acerca del mecanismo de la formación de pirimidinas a partir de alquil y alquilarilcetonas. Sin embargo, en la reacción a partir de cetonas cíclicas **74**, que conduce a la formación de

¹⁹² Nolis, P.; Espinosa, J.F.; Parella, T. *J. Magn. Reson.*, **2006**, *180*, 39-50.

¹⁹³ Saurí, J.; Espinosa, J.F.; Parella, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 3919-3922.

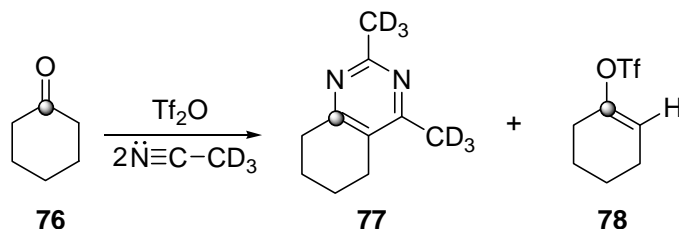
¹⁹⁴ Saurí, J.; Parella, T. *Magn. Reson. Chem.*, **2012**, *50*, 717-721.

pirimidinas bicíclicas **75**, se produce una serie de aspectos particulares y anómalos. Entre ellos se encuentra la inexplicable menor reactividad de las cetonas cíclicas, que si bien conducen a la formación de pirimidinas, requieren para ello condiciones experimentales más enérgicas, siendo más bajos los rendimientos obtenidos (Esquema 28).¹⁹⁵



Esquema 28

Como una extensión de nuestros resultados mecanísticos previos, procederemos a realizar el seguimiento en tiempo real mediante UF-NMR, de la reacción de una cetona cíclica como la ciclohexanona- α - ^{13}C **76**, con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 . Se forma la 2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahydroquinazolina- d_6 **77** como producto principal (80%) y el triflato de 1-ciclohexenilo **78** como subproducto (20%) (Esquema 29).



Esquema 29

Con el fin de obtener una explicación lo más completa posible, emplearemos una nueva estrategia, basada en la aplicación de una combinación de secuencias escalares de UF-NMR homo y heteronucleares, que ha sido desarrollada en nuestro grupo de trabajo. La secuencia en tándem 2D UF-TOCSY-HMBC debe permitir la monitorización en tiempo real del sistema de reacción de manera

¹⁹⁵ Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Ramiro, P.; Chioua, M.; Torres, R. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 3755-3764.

dinámica, a través de correlaciones tanto homo como heteronucleares,¹⁹⁶ suministrando con ello una información completa sobre la naturaleza de las diferentes especies participantes en la reacción. De esta forma, la parte de la secuencia que describe el experimento UF-HMBC permitirá diferenciar entre las especies presentes en el proceso y la parte de la secuencia que corresponde al experimento UF-TOCSY posibilitará obtener detalles estructurales de su conectividad entre los núcleos de protón pertenecientes al mismo sistema de espines.

La Figura 4.1 muestra la secuencia combinada en cuestión, la cual consiste en un esquema 2D UF-TOCSY-HMBC modulado en amplitud. Para la secuencia homonuclear TOCSY se adquieren los espectros con un solo *scan* y se precisan valores bajos de la ganancia del receptor. Sin embargo, debido a su sensibilidad apreciablemente menor, la secuencia heteronuclear HMBC requiere valores elevados de la ganancia del receptor y frente a la imposibilidad de tener dos valores diferentes para cada experimento, éstos últimos se adquieren con cuatro *scans*. A pesar de este pequeño inconveniente, esta secuencia en tándem puede ser aplicada de manera directa en un espectrómetro convencional dotado con un único receptor, representando pues, una alternativa simple al método UF-PUFSY (apartado II.3.2) descrito recientemente. A través de esta metodología se pueden obtener varios espectros 2D de UF-NMR en paralelo, pero precisa para ello la disposición de varios receptores en el equipo de RMN.¹⁹⁷

¹⁹⁶ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

¹⁹⁷ Donovan, K. J.; Kupče, E.; Frydman, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1-5.

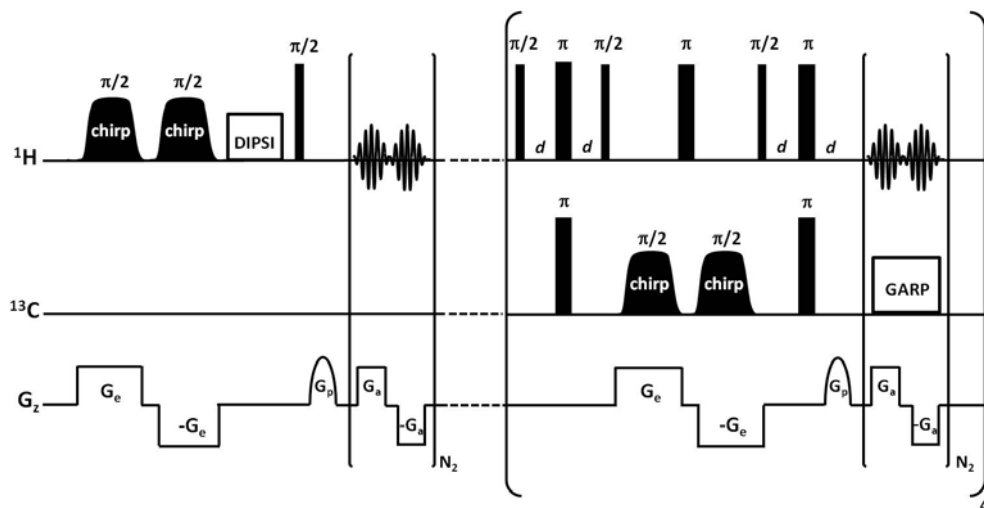


Figura 4.1. Esquema de la secuencia en tandem 2D UF-TOCSY-HMBC dinámica empleada para el seguimiento de reacciones orgánicas en tiempo real. Permite la monitorización de correlaciones homo y heteronucleares en un único experimento.

Análogamente a los sistemas reactivos estudiados con anterioridad, con el fin de determinar cuáles son las zonas espectrales de interés para el seguimiento de este sistema mediante la secuencia en tandem 2D UF-TOCSY-HMBC, se han realizado experimentos tradicionales preliminares de RMN 1D y 2D de la mezcla de reacción. Ello permite visualizar cuáles son las áreas en las que se produce la evolución de los reactivos, donde aparecen las correlaciones de los productos finales y se detecten posiblemente, nuevas especies de carácter intermedio. Así, en la Figura 4.2 se observan las señales de la ciclohexanona de partida (flechas **rojas**), de la pirimidina final (flechas **azules**), así como nuevas señales en la zona olefínica y otras desapantalladas en la zona alifática, señaladas con flechas negras, cuyo origen se trata de determinar.

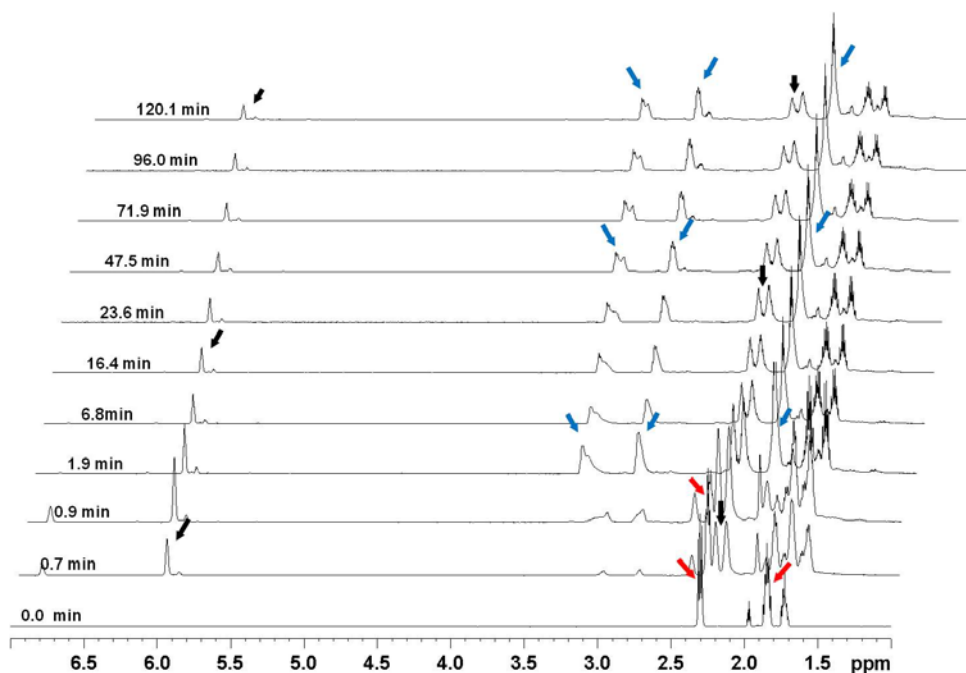


Figura 4.2. Seguimiento mediante espectroscopía de RMN de ^1H de la reacción de ciclohexanona- α - ^{13}C (marcada en **rojo**) con Tf_2O en presencia de acetonitrilo- d_3 , para dar lugar a la formación de la pirimidina 2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahidroquinazolina- d_6 (marcada en **azul**).

A partir de los experimentos 1D, 2D realizados se ha comprobado que para este estudio se requiere barrer amplios rangos espectrales tanto en la dimensión directa (^1H) como en la indirecta (^{13}C). Por este motivo y con el fin de no incurrir en condiciones experimentales que sean demasiado exigentes para el equipo, se decidió realizar el seguimiento en dos experimentos individuales en los que cada uno barre ventanas espectrales diferentes A y B. Estas involucran respectivamente 3.0 y 5.0 ppm a largo del canal de ^1H y 67.0 y 60.0 ppm en el canal de ^{13}C .

La reacción se realiza en el interior de un espectrómetro 500 MHz, equipado con una sonda de RF BBO a 278 K. Para la adición de los reactivos desde el exterior del imán al interior del tubo de RMN se ha empleado el sistema de inyección descrito en el apartado VI.3.

En este caso, dentro del tubo de RMN se dispone la ciclohexanona- α - ^{13}C **76** y el acetonitrilo- d_3 como disolvente y dentro de la cánula del sistema de inyección el

anhídrido tríflico. Una vez montado todo el sistema y ajustada la altura del tubo de resonancia, éste se introduce en el imán y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición de los experimentos dinámicos se inicia con antelación a la inyección del Tf_2O . El **rango espectral A** comprende de 0.75-3.75 ppm en ^1H y 151.5-218.5 ppm en ^{13}C . Se adquieren 500 espectros 2D UF-TOCSY-HMBC en un tiempo total de 4.96 horas. Cada experimento UF-TOCSY, con un solo *scan*, se registra en 0.123 s y cada experimento UF-HSQC requiere 0.148 s. Para éste se registran 4 *scans*, que incluyen un *delay* de 5 segundos entre ellos, requiriéndose entonces en total 20.59 s. Un solo experimento combinado 2D UF-TOCSY-HMBC necesita un total de 35.75 s, que incluyen el tiempo de repetición (10 s) entre cada medida.

El **rango espectral B** abarca de 1.3-6.8 ppm en ^1H y 115.0-175.0 ppm en ^{13}C y se adquieren 500 espectros 2D UF-TOCSY-HMBC en un tiempo total de 4.95 horas. Cada experimento UF-TOCSY, con un solo *scan* se registra en 0.106 s y cada experimento UF-HSQC requiere 0.131 s. Asimismo, para éste se registran 4 *scans*, que incluyen un *delay* de 5 segundos entre ellos, necesitándose en total 20.52 s. Este experimento combinado requiere 35.66 s, incluyendo el tiempo de repetición de 10 s entre cada medida. Los datos experimentales, así como los parámetros de adquisición optimizados para estos experimentos se han incluido en el apartado VI.6.

En la Figura 4.3 se muestran algunos espectros 2D UF-TOCSY-HMBC representativos de diferentes instantes de la reacción para las dos áreas estudiadas. En ellos se encuentra señalado con flechas de colores las correlaciones pertenecientes a las diferentes especies participantes de la reacción.

El **rango espectral A** abarca 3.0 ppm en ^1H , con el centro de la ventana situado en 2.25 ppm, y 67.0 ppm en ^{13}C , con el centro en 185.0 ppm. Ello permite obtener información tanto de la evolución de la parte alifática (^1H), como de la zona carbonílica y aromática (^{13}C) del proceso. Los espectros UF-HMBC permiten visualizar las diferentes especies presentes y detectadas en la reacción, a través de las señales de correlación a larga distancia entre el carbono carbonílico de la ciclohexanona- α - ^{13}C **76** a 212.2 ppm y sus protones alifáticos situados a 1.85 y

2.30 ppm, respectivamente (flechas **rojas**); estas señales disminuyen en intensidad a medida que avanza la reacción y desaparecen completamente después de 9.43 minutos. Las señales de cruce correspondientes al producto final (2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahydroquinazolina-*d*₆, **77**) a 169.2 ppm, derivadas de la correlación entre C4 y los protones alifáticos del biciclo a 1.96, 2.89 y 3.25 ppm en ¹H (flechas **azules**), comienzan a ser visibles a partir del minuto 49.50 y su intensidad aumenta paulatinamente, como es de esperar. Estas correlaciones han sido confirmadas mediante experimentos tradicionales de RMN 1D y 2D (apartado VI.9.5).

Los experimentos UF-TOCSY ofrecen un mayor detalle de los cambios producidos en la zona estudiada. Como es de esperar, se observa la clara disminución de las señales de correlación del reactivo de partida **76** a 2.30/1.85, 2.30/1.73 y 1.85/1.73 ppm. A los 4.80 minutos de haber iniciado la reacción es posible apreciar nuevas señales de cruce a 2.25/1.62, 2.18/1.62 y 1.73/1.62 ppm (flechas **amarillo oscuro**), las cuales incrementan gradualmente su intensidad y a tiempos avanzados del proceso van decayendo. A partir del minuto 9.94 empiezan a observarse, cada vez con más claridad, las señales de la pirimidina **77** a 3.25/2.89, 3.25/1.96 y 2.89/1.96 ppm. Llama la atención que con el experimento heteronuclear, la pirimidina sólo es perceptible 50 min aproximadamente después de haberse iniciado la reacción, mientras que la mayor sensibilidad del experimento homonuclear permite observar que este producto ya se empieza a formar en los primeros estadios del proceso.

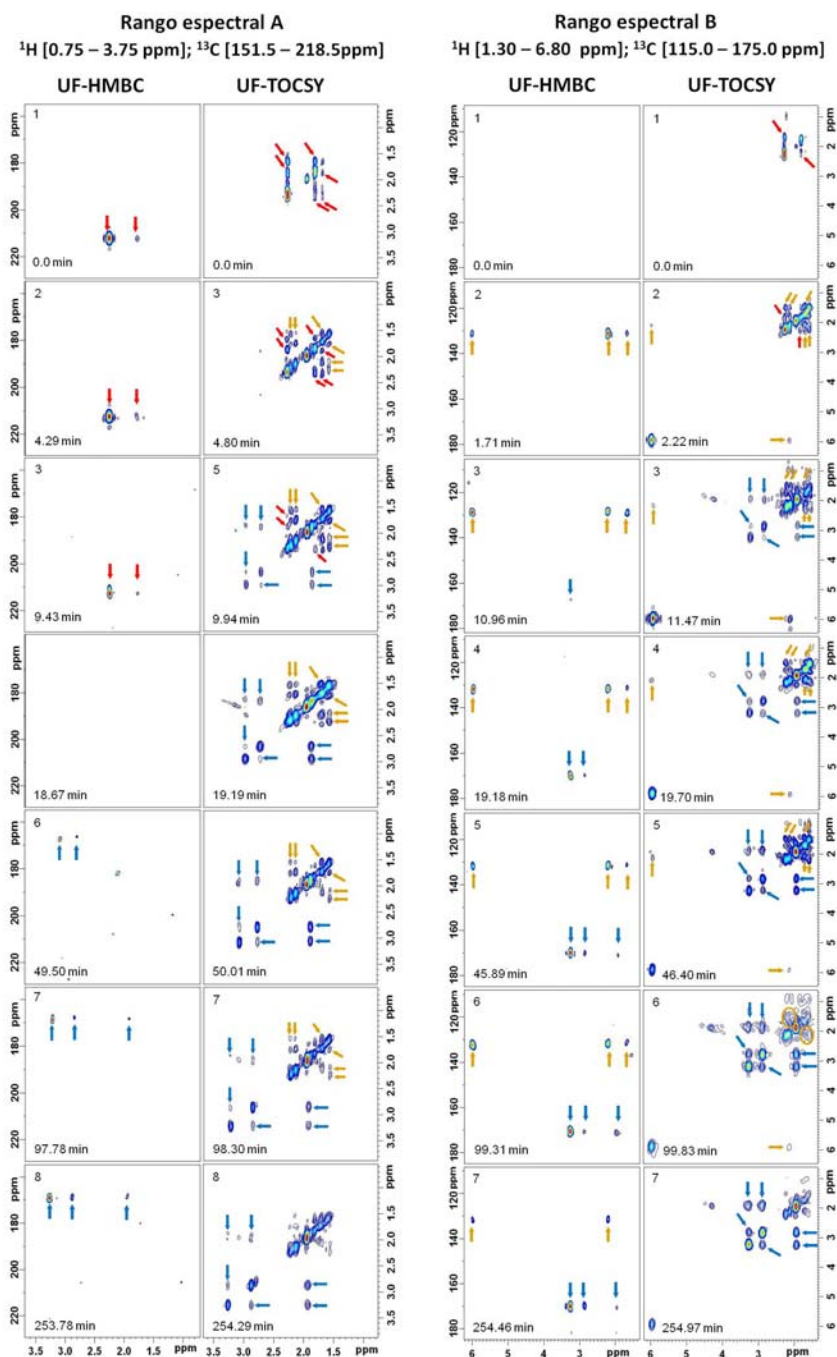


Figura 4.3. Selección de experimentos en tándem 2D UF-TOCSY-HMBC para los dos rangos espectrales estudiados en el seguimiento de la reacción de ciclohexanona- α - ^{13}C **76**, con anhídrido trifílico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 .

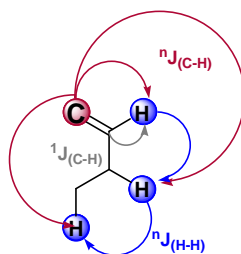
Seguidamente se monitoriza el **rango espectral B**, que abarca una anchura superior y dispone de un centro de ventana diferente. La dimensión del ^1H comprende 5.0 ppm, con la ventana centrada en 3.8 ppm, con el fin de incluir los fenómenos que tengan lugar en la zona olefínica y 60.0 ppm en ^{13}C , centrada en 145.0 ppm, lo que facilita observar la evolución de las zonas olefínica y aromática de la reacción.

En los primeros espectros UF-HMBC de esta zona espectral B, no se observa la aparición de especie alguna en particular, ya que la ciclohexanona inicial se encuentra fuera del rango estudiado. Sin embargo, estos experimentos permiten obtener una información crucial sobre la estructura de la especie intermedia detectada en los espectros UF-TOCSY del **rango espectral A**. Además de las señales ya mencionadas para la pirimidina **77** (flechas **azules**), a los 19.18 minutos se observa un nuevo grupo de señales de correlación a larga distancia provenientes del acoplamiento entre un carbono olefínico a 131.8 ppm con protones olefínicos y alifáticos 5.99, 2.25 y 1.73 ppm respectivamente (flechas **amarillo oscuro**). Estas correlaciones están presentes desde el principio de la reacción (minuto 1.7), hasta los últimos instantes del seguimiento. Además, su intensidad decrece gradualmente, mostrando con ello el carácter de especie intermedia.

Los espectros UF-TOCSY para esta segunda área estudiada evidencian una menor resolución espectral en la zona alifática. Aun así, se confirma que los protones olefínicos y alifáticos de la especie intermedia (flechas **amarillo oscuro**) se acoplan entre sí y pertenecen por tanto al mismo sistema de espines.

Es importante resaltar que en los espectros registrados no se observa la formación del triflato de 1-ciclohexenilo **78**, subproducto de la reacción. Probablemente se encuentre por debajo del límite de detección del experimento combinado.

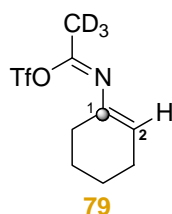
Como dato adicional importante hay que mencionar que a partir de experimentos 2D tradicionales de la mezcla de reacción, se observa que el protón a 5.99 se acopla de manera directa con un carbono a 124.9 ppm. Por tanto es evidente, que la especie intermedia detectada posee un elemento estructural en el que un carbono marcado isotópicamente y cuaternario (131.8 ppm) se acopla a larga distancia con un protón olefínico (5.99 ppm) y con otros dos alifáticos (2.25 y 1.73 ppm), tal y como se muestra en el Esquema 30.



Esquema 30

Estos datos observados en los experimentos ultrarrápidos fueron comparados con la modelización de diferentes sales de nitrilo olefínicas análogas a otras especies propuestas para el mecanismo de reacción de los sistemas anteriormente estudiados y ninguna de ellas se ajustaba de manera adecuada a los datos obtenidos. Tras un cuidadoso estudio de modelización, el origen de estas señales se ha atribuido finalmente a la especie intermedia **79**, que se muestra en el esquema 31.

La formación de **79** cabe explicarse a través de la captura de una molécula de acetonitrilo- d_3 y posterior formación de un enlace covalente con el anión triflato (OTf) presente en el medio, en lugar de formar una especie iónica, como ocurre con otras cetonas estudiadas.



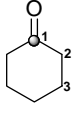
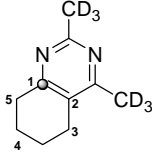
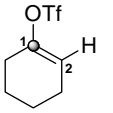
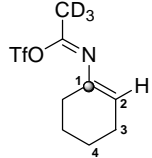
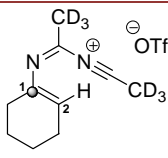
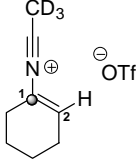
79
Esquema 31

Los valores de los desplazamientos químicos de 1H y ^{13}C -RMN del intermedio **79** observados, están en buena concordancia con los valores estimados para dicha estructura a partir de los programas Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8.00 y un conjunto de programas Gaussian 09¹⁹⁸ empleando el método GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G*.¹⁹⁹

¹⁹⁸ Frisch, M. J. et al. Gaussian 09, revision B.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.

¹⁹⁹ Los desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN han sido calculados mediante el conjunto de programas Gaussian 09 utilizando la aproximación GIAO, el funcional metahíbrido M06-2X y las funciones de base de calidad doble-zeta 6-31+G*. Los efectos del disolvente (acetonitrilo) se han calculado empleando el método PCM (Polarizable Continuum Model). Este método se denomina GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G* (ver apartado II.7).

Tabla 4.1. Desplazamientos químicos observados y calculados para las diferentes especies involucradas en el mecanismo propuesto de reacción y otras de posible formación.

Especies detectadas	Estructura	δ Observados (CD ₃ CN)		δ Calculados (CDCl ₃) ^{a,b}	δ Calculados GAUSSIAN 09 ^c	
		¹ H	¹³ C		¹³ C B3LYP	¹³ C M062X
76		H ₂ : 2.30 H ₃ : 1.85 H ₄ : 1.73	C ₁ : 212.2	H ₂ : 2.2 H ₃ : 1.6 H ₄ : 1.4 C ₁ : 211.5	C ₁ : 211.6	
77		H ₃ : 1.96 H ₄ : 2.89 H ₅ : 3.25	C ₁ : 169.2	H ₃ : 2.6 H ₄ : 1.9 H ₅ : 2.9 C ₁ : 163.1 C ₂ : 126.0	C ₁ : 161.7 C ₂ : 124.3	C ₁ : 181.7 C ₂ : 140.3
78		H ₂ : 5.8	C ₁ : 150.3	H ₂ : 5.8 C ₁ : 153.2 C ₂ : 117.5	C ₁ : 146.7 C ₂ : 124.0	C ₁ : 157.4 C ₂ : 137.5
79				H ₂ : 5.8 H ₃ : 2.0 H ₄ : 1.6 C ₁ : 147.8 C ₂ : 113.8	C ₁ : 137.3 C ₂ : 130.0	C ₁ : 158.1 C ₂ : 128.5
e		5.99 2.25 1.73	C ₁ : 131.8 C ₂ : 124.9 ^d	H ₂ : 5.5 C ₁ : 148.0 C ₂ : 112.0	C ₁ : 144.1 C ₂ : 116.4	C ₁ : 160.2 C ₂ : 125.6
e				H ₂ : 5.9 C ₁ : 136.7	C ₁ : 118.9 C ₂ : 146.4	C ₁ : 135.0 C ₂ : 160.7

a) Valores obtenidos mediante el programa ACD/Labs (Release 8.00). **b)** Las diferencias existentes entre los valores de los desplazamientos químicos observados y calculados son debidos a la naturaleza del disolvente. **c)** Calculado con TMS (δ ¹³C= valor δ del TMS en Gaussian09 – valor δ del compuesto en Gaussian09). **d)** Obtenido a partir de un espectro 2D HSQC tradicional. **e)** Posibles especies intermedias, que también han sido modelizadas. Los datos observados indican que la especie detectada es **79**.

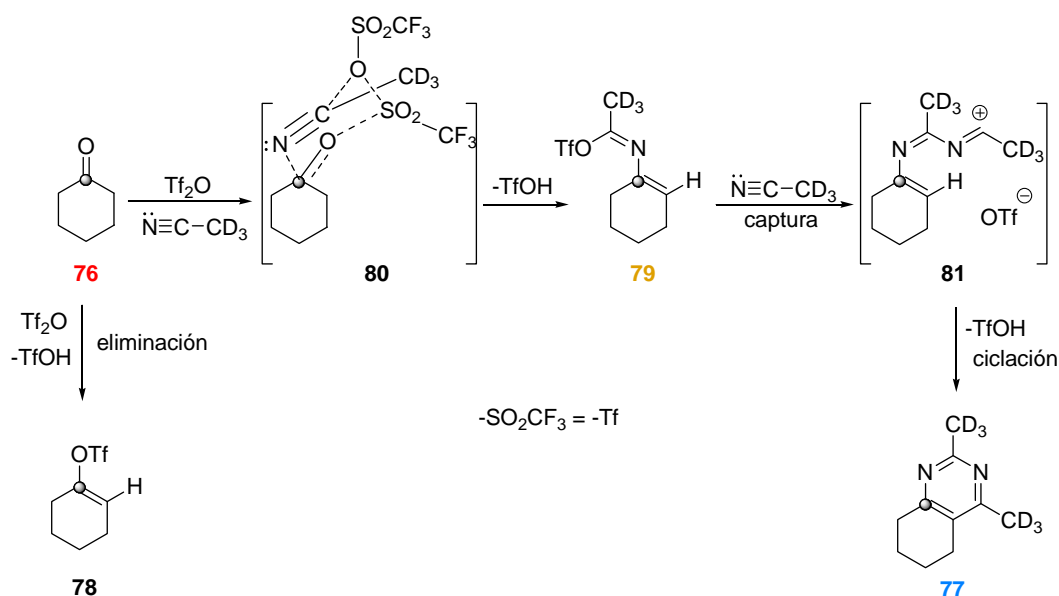
Adicionalmente, los cálculos indican que el grupo triflato se encuentra en disposición *trans* con respecto al doble enlace C=C del anillo ciclohexénico de la especie intermedia **79**. En la Tabla 4.1 se muestran los valores observados y los teóricos para diferentes intermedios de posible formación.

En nuestra opinión, la formación de **79** está favorecida dada la dificultad de la molécula de la ciclohexanona para estabilizar cargas. Por tanto, en un medio fuertemente nucleófilo (CD₃CN) y por ataque del Tf₂O, puede formarse un complejo cetona/Tf₂O/CD₃CN, **80** (Esquema 32), especie para la cual ya existen precedentes.²⁰⁰

La evolución de **80** mediante eliminación de TfOH dará lugar al intermedio postulado **79**. Su rápida solvolisis y captura nucleófila posterior, da lugar a la sal de nitrilio **81**, que finalmente tras su ciclación y eliminación posterior de TfOH conduce a la pirimidina **77**.

La no observación de otras especies intermedias se atribuye a la estructura saturada de la ciclohexanona, ya que probablemente estos intermedios no posean la estabilidad suficiente para coexistir durante un tiempo tal que permita su detección por UF-NMR.

²⁰⁰ Pardo, Z.D.; Olsen, G.L.; Fernández-Valle, M.E.; Frydman, L.; Martínez-Álvarez, R.; Herrera, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 2706-2715.



Esquema 32

La integración de las señales de correlación presentes en los espectros 2D UF-TOCSY-HMBC proporciona una valiosa información relativa a la concentración de las especies participantes. Así, en la Figura 4.4 se muestra el valor de la integral para cada especie detectada durante el transcurso de la reacción, frente al tiempo del experimento dinámico. Mediante las curvas obtenidas es posible seguir el comportamiento que manifiesta cada una de las especies: así, la ciclohexanona (**76**) decae inmediatamente una vez iniciada la reacción, el intermedio (**79**) aparece rápidamente al inicio de la misma y decrece hasta llegar a un nivel casi estacionario cercano al ruido, mientras que el producto final detectado, la pirimidina (**77**), se intensifica según avanza el proceso.

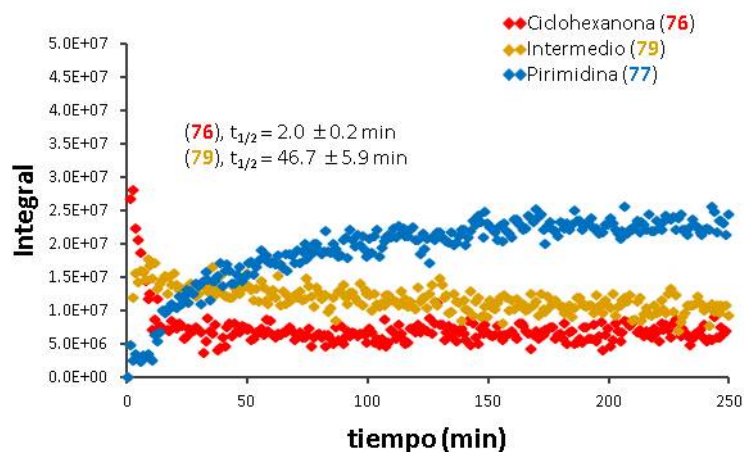


Figura 4.4. Integrales promedio de las señales de correlación de las especies detectadas durante la monitorización de la reacción, en función del tiempo.

Para el cálculo de las integrales se ha empleado un programa escrito en lenguaje Matlab 7.11. y diseñado en nuestro grupo de trabajo,²⁰¹ el cual procesa los espectros para cada uno de los experimentos, empleando los mismos parámetros para todos ellos. En este caso en particular los espectros corresponden a la suma de los datos adquiridos durante los gradientes tanto positivos como negativos. A partir del ajuste de estas curvas a la ecuación $I(\tau) = I_0 e^{(-\tau/t_{1/2})} + I_\infty$ es posible calcular el tiempo de vida media, $t_{1/2}$, de las especies participantes, los cuales se muestran en la Figura 4.4.

En resumen en el Capítulo 4 se ha abordado la aplicación de la secuencia combinada de correlación homo y heteronuclear 2D UF-TOCSY-HMBC modulada en amplitud y desarrollada en nuestro grupo de trabajo, al estudio de la monitorización en tiempo real de la reacción de la ciclohexanona- α - ^{13}C **76**, con anhídrido triflico ($\text{ Tf}_2\text{O}$) en presencia de acetonitrilo- d_3 , para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahidroquinazolina- d_6 **77**. Cabe mencionar aquí que:

²⁰¹Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

- Se han optimizado los parámetros de adquisición de la secuencia combinada para obtener una relación S/R y una resolución óptima en el seguimiento de la reacción en tiempo real.
- Se ha realizado la monitorización de la reacción en cuestión en un equipo estándar de RMN de 500 MHz, dotado de una sonda de RF BBO, en el interior de un tubo de resonancia de 5 mm. Se han barrido dos rangos espectrales diferentes y para cada uno de ellos se han registrado en total 500 espectros UF-TOCSY y UF-HMBC en un tiempo de 4.96 horas aproximadamente.
- A través de la secuencia combinada 2D UF-TOCSY-HMBC se han podido detectar las señales de cruce de una nueva especie intermedia **79**, de carácter no iónico.
- Se ha confirmado la asignación estructural de todas las especies detectadas y posibles en este estudio, empleando el programa de modelización Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8 y de manera mas exhaustiva, mediante cálculos mas complejos realizados con un conjunto de programas Gaussian 09 y el método GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G*. Los valores de los desplazamientos químicos observados se encuentran en muy buena concordancia con los calculados.
- Se ha comprobado que los experimentos UF-TOCSY reflejan cambios muy rápidos en el progreso de la reacción, mientras que en los experimentos UF-HMBC los cambios necesitan de un tiempo más dilatado, debido a la diferencia de sensibilidad de ambas técnicas.
- Asimismo, se ha puesto de manifiesto que la secuencia UF-HMBC presente en el bucle, ofrece información sobre el número y tipo de especies diferentes a lo largo del sistema estudiado, mientras que la secuencia UF-TOCSY proporciona detalles estructurales complementarios para cada una de las especies anteriormente detectadas. Con todo ello, se puede afirmar que el bucle UF-TOCSY-HMBC constituye una perfecta combinación de técnicas ultrarrápidas para la determinación estructural dinámica.

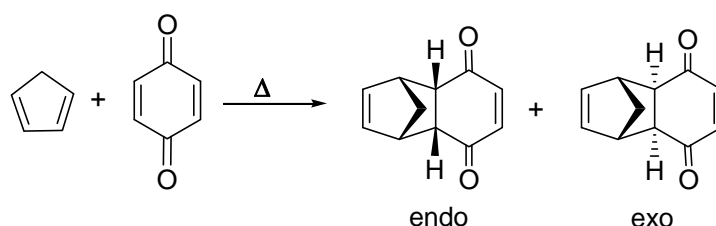
- Los resultados obtenidos han permitido proponer una alternativa mecanística para la formación de pirimidinas a partir de cetonas cíclicas. Las características estructurales de dichas cetonas parecen desfavorecer la formación de intermedios iónicos estables (como en los casos anteriores). Para este sistema, se puede concluir que los habituales intermedios iónicos no llegan a la concentración crítica mínima para ser observados mediante UF-NMR.
- Ha sido posible obtener datos cinéticos del proceso estudiado, obteniendo con ello valiosa información relativa a la concentración de las especies participantes, así como sus tiempos de vida media ($t_{1/2}$).
- Finalmente estos resultados confirman, una vez más, que la metodología de UF-NMR, aplicada al seguimiento del acoplamiento tanto homo como heteronuclear constituye un método eficaz para la monitorización de reacciones orgánicas en tiempo real y la posterior dilucidación de sus mecanismos de reacción.

Capítulo 5: Estudio de otros sistemas dinámicos. Reacción de Diels-Alder y Michaelis-Arbuzov

Las reacciones concertadas constituyen un área importante de la Química Orgánica. Por ello, una vez que se ha puesto de manifiesto la utilidad de la UF-NMR en la monitorización de reacciones por pasos, cuyo mecanismo se desarrolla a través de diferentes intermedios reactivos, hemos querido evaluar los resultados de la monitorización en tiempo real de una importante reacción concertada, en la cual los enlaces se rompen y se forman simultáneamente, como es la cicloadición de Diels-Alder.

5.1. Seguimiento en tiempo real de una reacción de cicloadición Diels-Alder [4+2]

Las reacciones de cicloadición constituyen uno de los métodos tradicionales para la formación de sistemas cíclicos. Dentro de ellas, se encuentra la reacción de Diels-Alder, que consiste en una reacción pericíclica entre un sistema diénico conjugado y otro insaturado denominado filodieno. En el Esquema 33 se muestra una de las primeras cicloadiciones descritas, entre el ciclopentadieno y la *p*-benzoquinona.²⁰²



Esquema 33

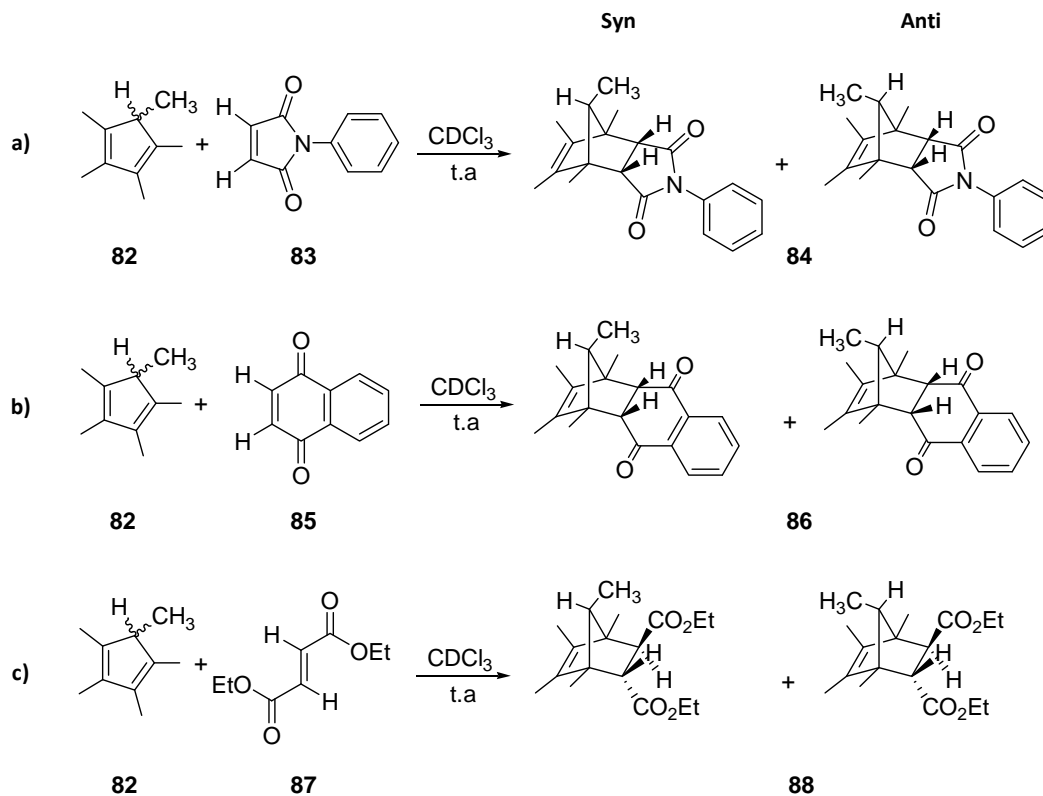
La mayoría de las reacciones Diels-Alder involucran un dieno que porta grupos sustituyentes donantes de electrones y un filodieno con sustituyentes electroattractores (por ejemplo grupos CO, CN, etc.). Dieno y filodieno siguen una estereoquímica de acercamiento suprafacial entre ellos. Se trata de una reacción estereoselectiva ya que cabe la formación de dos aductos posibles *endo* y *exo*. Sin embargo, debido a que el aducto *endo* deriva de una interacción energética estabilizante adicional entre los orbitales moleculares del filodieno y los orbitales del dieno, su formación está favorecida.²⁰³

²⁰² Diels, O.; Alder, K. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1928**, 460, 98-122.

²⁰³ Clayden, N.G.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*, 2^{da} ed.; Oxford University Press Inc.: New York, 2012.

Con frecuencia, las cicloadiciones Diels-Alder requieren condiciones de reacción enérgicas como reflujo con disolventes de alto punto de ebullición y tiempos de reacción prolongados, aunque también es posible llevarlas a cabo haciendo uso de catalizadores.²⁰⁴ Estos detalles experimentales impiden llevar a cabo el seguimiento de este tipo de reacciones en el interior de un equipo de RMN, en un tubo de 5mm.

Se decidió por ello abordar el estudio de reacciones Diels-Alder que transcurrieran a temperatura ambiente y en un tiempo razonable, como ocurre con el 1,2,3,4,5 pentametilciclopentadieno **82** (PMCP) al reaccionar con diferentes filodienos como (a) la *N*-fenilmaleinimida **83**, (b) la 1-4-naftoquinona **85** o (c) el fumarato de dietilo **87**, tal y como se muestra en el Esquema 34.^{205, 206}



Esquema 34

²⁰⁴ Fringuelli, F.; Taticchi, A. Diels-Alder Reaction Compilation, in *The Diels-Alder Reaction: Selected Practical Methods*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2002.

²⁰⁵ Werner, S.; Curran, D. P. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 3293-3296.

²⁰⁶ Burnell, J.; Valenta, Z. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 18, 1247-1248.

Los aductos correspondientes (**84**, **86**, **88**) se emplearon como patrones a lo largo de este estudio y se obtuvieron siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado VI.11.

Las pruebas preliminares con las tres cicloadiciones elegidas, registrando espectros de ^1H -RMN a tiempos crecientes de reacción, mostraron que estas reacciones transcurren con rapidez. Sin embargo, se observa una disminución apreciable de la velocidad de reacción al pasar del sistema (a) al (b) al (c). Ello no debe sorprender, puesto que como es sabido, la reactividad esperable se encuentra íntimamente relacionada con la diferencia energética (ΔE) HOMO-LUMO entre los orbitales moleculares participantes del dieno y el filodieno respectivamente. Cuanto mayor sea ΔE , menor será la reactividad del sistema en cuestión. En el caso del PMCP y el fumarato de dietilo (*sistema c*), su ΔE es superior en comparación con los otros dos dienófilos,²⁰⁷ haciendo que de los tres sistemas, sea este el mejor candidato para ser monitorizado en tiempo real mediante UF-NMR.

En la Figura 5.1 se observa el seguimiento 1D para el sistema de reacción (c) entre el PMCP (flechas **rojas**) y el fumarato de dietilo (flechas **verdes**), que da lugar a la formación del aducto 1,4,5,6,7-pentametilbicyclo [2.2.1] hept-5-ene-2,3-dicarboxilato de dietilo (flechas **azules**). Tan pronto como se mezclan los reactivos, se observan señales del aducto. A pesar de esta aparente velocidad de reacción, al final del proceso es posible detectar una cantidad importante de PMCP sin reaccionar, lo cual se puede explicar debido a la baja difusión de los reactivos dentro del tubo de RMN.

²⁰⁷ Chioua, M. *Generación de nuevos o-quinodimetanos pirimidínicos y sus aplicaciones en la reacción Diels-Alder*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Julio de 2004.

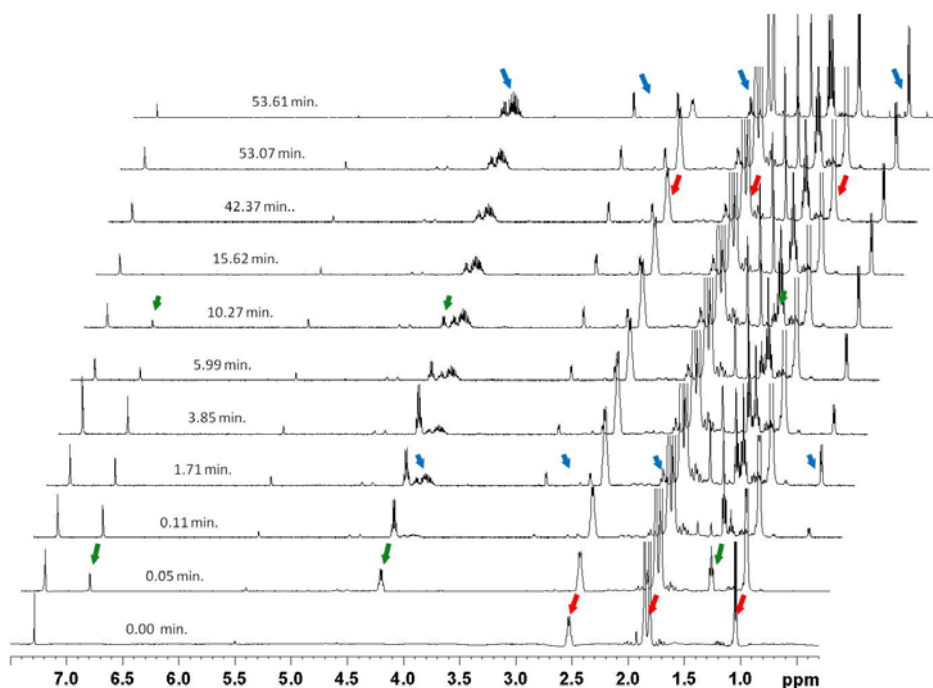


Figura 5.1. Seguimiento mediante espectroscopía de ^1H -RMN de la reacción del 1,2,3,4,5-pentametilciclopentadieno (marcado en rojo) y el fumarato de dietilo (marcado en verde), en CD_2Cl_2 (298 K), para dar lugar a la formación del aducto 1,4,5,6,7-pentametilbicyclo [2.2.1] hept-5-ene-2,3-dicarboxilato de dietilo (marcado en azul), sistema (c).

Se pretende pues, seguir el desarrollo del proceso a través de la secuencia de pulsos 2D UF-TOCSY, observando la transformación de los reactivos a producto final mediante la evolución de sus acoplamiento escalares. Este programa de pulsos ha sido aplicado con anterioridad en otros sistemas de reacción (capítulos 2 y 4).

Asimismo, nuestra intención era completar este seguimiento escalar mediante 2D UF-TOCSY, con lo que pudiera aportar la secuencia 2D UF-NOESY en relación a los acoplamiento dipolares, que suministrarían información acerca de las interacciones generadas en el acercamiento de las dos moléculas reactivas. Sin embargo esto último no ha sido posible dadas ciertas dificultades experimentales, pues el estudio de la interacciones dipolares de estos dos reactivos requiere tamaños grandes de ventana espectral, que como se ha expuesto anteriormente la metodología de UF-NMR no puede conseguir (apartado II.4.1). Además, esta reacción se produce a una velocidad tal que no da

tiempo para que dichas interacciones puedan ser detectadas. En la actualidad se sigue trabajando en el desarrollo de la secuencia 2D UF-NOESY estándar y en nuevas alternativas como la 2D UF-*exo*NOESY.²⁰⁸

La Figura 5.2 muestra un esquema de la secuencia 2D UF-TOCSY empleada en la monitorización de esta reacción mediante acoplamientos escalares homonucleares. La secuencia está compuesta por dos pulsos $\pi/2$ chirp para la excitación y almacenamiento, lo que da lugar a una esquema de excitación modulado según la amplitud de la magnetización. Seguidamente se aplica la etapa de mezcla, que para este caso es un bloque tipo DIPSI, tras el cual interviene un pulso duro de 90° , que devuelve la magnetización al plano transversal para finalmente ser medida mediante la secuencia EPSI. Otro aspecto particular de esta secuencia radica en que se repite de forma continua, de modo que se adquieren automáticamente experimentos UF-TOCSY según avanza el proceso dinámico. Entre cada dos experimentos consecutivos es necesario esperar un tiempo de repetición TR , de suficiente magnitud como para permitir la relajación completa de la magnetización del sistema estudiado.

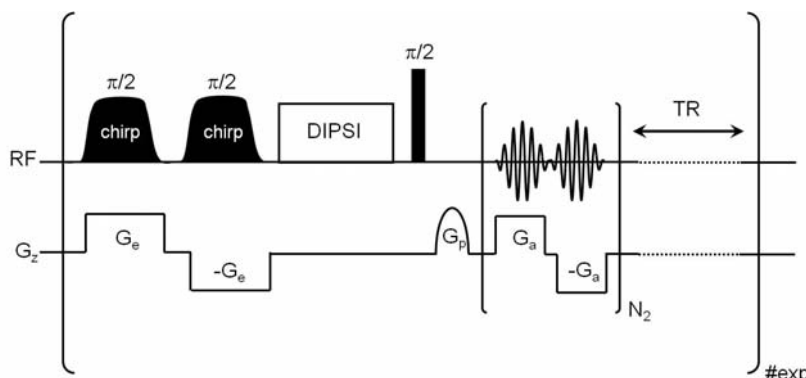


Figura 5.2. Esquema de la secuencia 2D UF-TOCSY dinámica, modulada en amplitud, empleada en la monitorización de la reacción Diels-Alder.

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en el interior de un espectrómetro 500 MHz, equipado con una sonda de RF BBO. Para la adición de los reactivos desde fuera del imán al interior del tubo de RMN se ha empleado el sistema de inyección descrito en el apartado VI.3.

²⁰⁸ Fernandez-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z.D.; Sáez, E.; Herrera, A. Ultrafast-*exo*NOESY: A New Tool for Monitoring Dipolar Coupling. Presentada en SMASH 2013 NMR Conference, Santiago de Compostela, España, Septiembre 22-25, 2013; Poster 34.

En el tubo de RMN se dispone el PMCP **82** y CDCl_3 como disolvente y dentro de la cánula del sistema de inyección, una solución de fumarato de dietilo **87** en CDCl_3 . Una vez ensamblada la cánula dentro del tubo de RMN, estos se introducen en el equipo, se regula la temperatura a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (valores del nivel del lock, sintonía de la sonda y homogeneidad del campo).

Se estudia una ventana espectral comprendida entre 0.0 y 4.8 ppm, que es la zona en donde se aprecian la mayoría de los cambios estructurales de la reacción. La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del fumarato de dietilo. Para el seguimiento del proceso, se adquieren 993 espectros 2D UF-TOCSY con dos *scans* cada uno, en un total de 104.83 min. Cada experimento requiere 3.16 seg incluyendo un tiempo de repetición de 3 s. Los datos experimentales, así como los parámetros de adquisición optimizados para este experimento se han incluido en el apartado VI.7.

En la Figura 5.3 se muestran algunos de los espectros 2D UF-TOCSY obtenidos en diferentes instantes de la reacción. En ellos se obtiene información desde el comienzo de la evolución de los reactivos iniciales y su transformación en aducto final. En los primeros instantes de la reacción se observa la presencia de la señal de correlación del PMCP a 2.50/1.02 ppm (flechas **rojas**) pertenecientes al acoplamiento a $^3J_{H,H}$ entre el metilo y el protón de la posición saturada del dieno y a 4.27/1.33 ppm (marcadas en **verde**) propias del resto etilo del filodieno fumarato de dietilo (esquema 35). Estas señales de cruce van disminuyendo en intensidad a medida que avanza el proceso de reacción, hasta su total desaparición.

A partir de 4.54 minutos de la mezcla de los reactivos, empiezan a crecer en intensidad las señales de correlación del aducto final, a 1.98/0.57, 3.02/2.63 y 4.10/1.27 ppm (flechas **azules**), correspondientes al acoplamiento a $^3J_{H,H}$ entre el metilo y el protón de la posición 7 del anillo bicíclico, al acoplamiento entre los protones en disposición *trans* en las posiciones 2 y 3 y al grupo etoxilo del aducto, respectivamente (esquema 35).

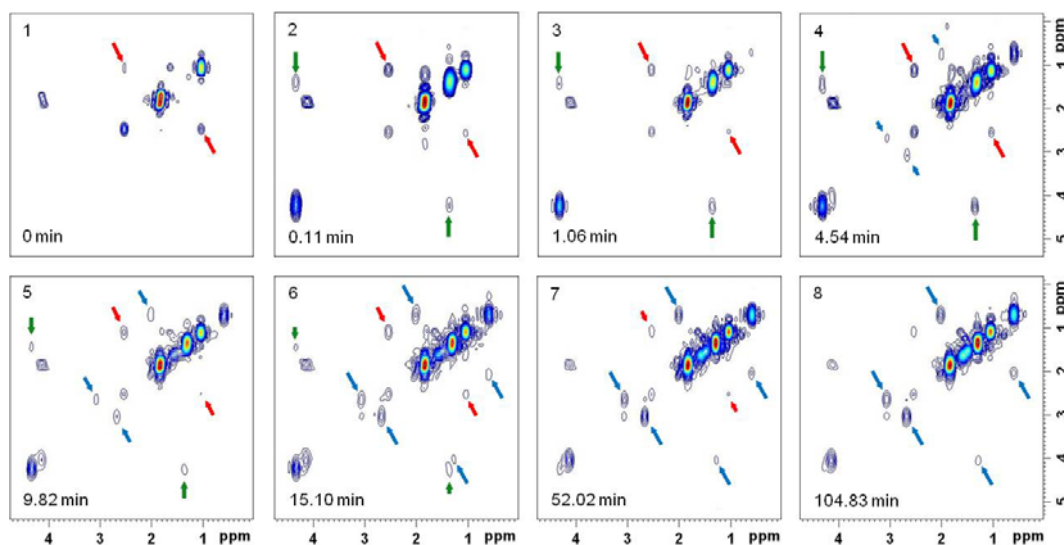


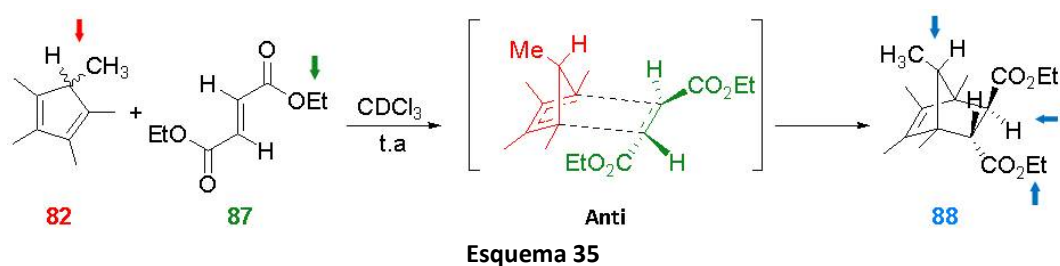
Figura 5.3. Selección de espectros 2D UF-TOCSY adquiridos en el seguimiento de la reacción cicloadición entre el PMCP (flechas **rojas**) y el fumarato de dietilo (flechas **verdes**), en presencia de CDCl_3 (298 K), para obtener el aducto correspondiente (flechas **azules**).

Estos resultados permiten confirmar que tal y como se esperaba para este tipo de reacciones pericíclicas que ocurren de manera concertada, transcurren sin la presencia de intermedios.

Tanto en el seguimiento de esta reacción mediante UF-TOCSY, como en el realizado a través de ^1H -RMN, se observa la formación exclusiva de uno de los dos aductos posibles. A partir de experimentos 1D NOESY selectivos, se ha establecido la posición del hidrógeno apical (posición 7 del anillo bicíclico) respecto al doble enlace, caracterizándolo como el isómero *anti* (apartado VI.11.3). Estos hechos permiten establecer que esta reacción es selectiva en cuanto a la cara por la que ataca el filodieno, haciéndolo por la cara menos impedida, tal y como se observa en el Esquema 35 y como es de esperar según se recoge en la bibliografía.^{209,210}

²⁰⁹ Carruthers, W. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*, 1^{ra} ed.; Pergamon Press: Oxford, Inglaterra, 1990.

²¹⁰ Burnell, J.D.; Valenta, Z. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 18, 1247-1248.



Finalmente es posible concluir que la metodología ultrarrápida es pues aplicable en la monitorización de reacciones en las que no están involucradas especies intermedias dado su carácter de sistemas concertados, tal como lo es la reacción de cicloadición [4+2] entre el PMCP y el fumarato de dietilo. La secuencia 2D UF-TOCSY permite el seguimiento dinámico del proceso y con ello, la observación en tiempo real de la evolución de reactivos a productos.

En capítulos anteriores ha quedado de manifiesto que la metodología de UF-NMR puede aplicarse satisfactoriamente en el seguimiento dinámico de reacciones en tiempo real, mediante la utilización de secuencias escalares homo (2D UF-TOCSY) y heteronucleares (2D UF-HSQC, UF-HMBC) o una combinación de ellas, monitorizando las correlaciones entre los núcleos más comunes en la química orgánica como lo son el ^1H y ^{13}C .

Sin embargo, existe un buen número de heteronúcleos menos comunes, entre ellos el ^{31}P , con una abundancia natural del 100%, que tienen aplicaciones muy importantes en catálisis, reacciones de formación de enlaces C-C y C-N, química médica, química verde y síntesis de productos naturales, entre otras, con lo que el estudio de RMN de estos heteronúcleos es de gran interés.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, la UF-NMR aún no ha sido aplicada al estudio dinámico de un sistema en base a correlaciones ^1H , ^{31}P . Por ello, en esta parte de la memoria queremos destacar nuestros resultados obtenidos en este sentido. Presentamos pues la monitorización mediante la secuencia 2D UF-HMBC ^1H , ^{31}P de la reacción de Michaelis-Arbuzov con formación de enlaces C-P.

5.2. 2D ^1H , ^{31}P UF-HMBC: Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov

La reacción de Michaelis-Arbuzov constituye uno de los procedimientos más versátiles en la formación de enlaces C-P y es el método tradicional en química orgánica para la obtención de fosfonatos, fosfinatos y óxidos de fosfina.^{211,212} Los fosfonatos son un grupo funcional clave en bioquímica²¹³ y en síntesis orgánica,²¹⁴ especialmente en la formación de enlaces C-C mediante la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons, que es una variante de la conocida síntesis de Wittig-Horner.²¹⁵

²¹¹ Brill, T.B.; Landon, S.J. *Chem. Rev.*, **1984**, *84*, 577-585.

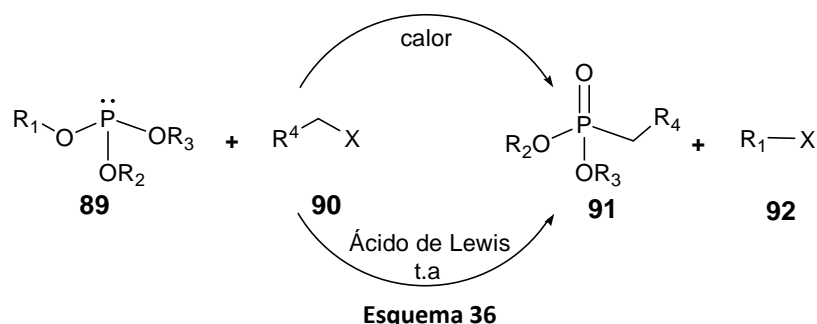
²¹² Bhattacharya, A.K.; Thyagarajan, G. *Chem. Rev.*, **1981**, *81*, 415-430.

²¹³ Metcalf, W.W.; Van der Donk, W.A. *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, *78*, 65-94.

²¹⁴ Engel, R.; Cohen, J.I. *Synthesis of Carbon-Phosphorous Bonds*, 2da. ed.; CRC Press: Boca Raton, 2004.

²¹⁵ Sulzer-Mossé, S.; Alexakis, A.; Mareda, J.; Bollot, G.; Bernardinelli, G.; Filinchuk, Y. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 3204-3220.

Tal como se observa en el Esquema 36, esta reacción en su forma más simple, parte de un fosfito de trialquilo **89** y un haluro de alquilo **90**, para dar lugar a la formación de un dialquil-alquilfosfonato **91**. Durante esta transformación, un fósforo trivalente, P(III), es convertido en un fósforo pentavalente, P(V). En general, el grupo alquilo del halogenuro es intercambiado por un grupo alquilo del fosfito de partida, formando como producto secundario un nuevo haluro de alquilo **92**.



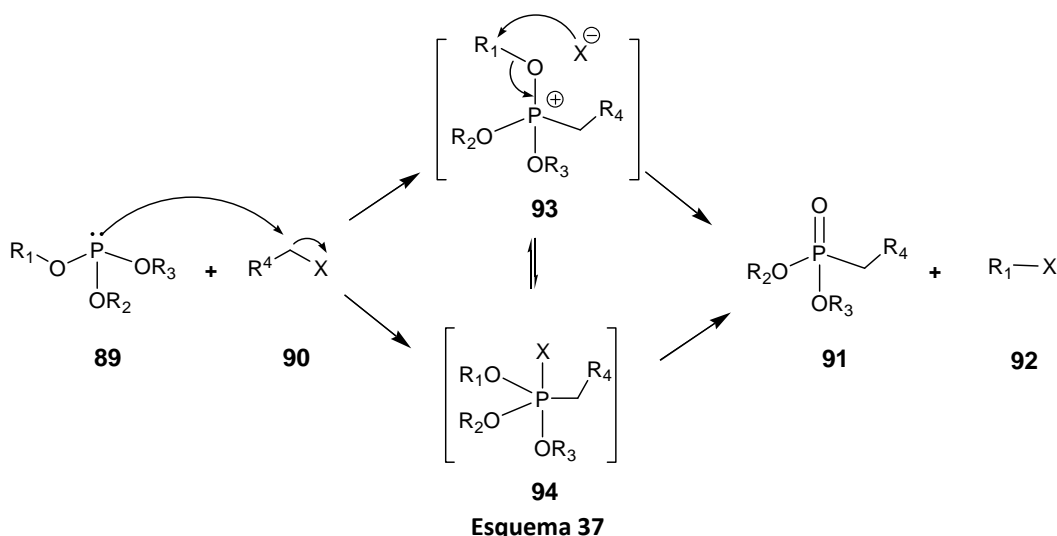
Esta reacción requiere elevadas temperaturas, así como el hecho de que el halogenuro de alquilo formado **92**, puede bajo las mismas condiciones experimentales, reaccionar con el fosfito de partida, reduciendo con ello el rendimiento y la eficiencia del proceso. Por esta razón, se han ido desarrollando métodos alternativos, empleando catalizadores que buscan lograr condiciones más suaves,²¹⁶ y entre ellos se encuentra la reacción catalizada por ácidos de Lewis como ZnBr₂ o ZnI₂,^{217,218} la cual puede llevarse a cabo a temperatura ambiente.

El mecanismo general aceptado para esta transformación, tal como se observa en el Esquema 37, involucra una reacción S_N2 del nucleófilo fosfito de trialquilo **89** con el haluro **90**, para dar lugar a la formación de una sal de fosfonio intermedia **93**. El anión haluro desplazado, a través de una segunda reacción S_N2 con el intermedio, produce un fosfonato **91** y un nuevo haluro de alquilo **92**.

²¹⁶ (a) Renard, P.; Vayron, P.; Mioskowski, C. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 1661-1664. (b) Das, B.; Dadomar, K.; Bhunia, N. *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 5607-5609. (c) Yang, G.; Shen, C.; Zhang, L.; Zhang, W. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 5032-5035. (d) Barney, R.J.; Richardson, R.M.; Wiemer, D.F. *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 2875-2879.

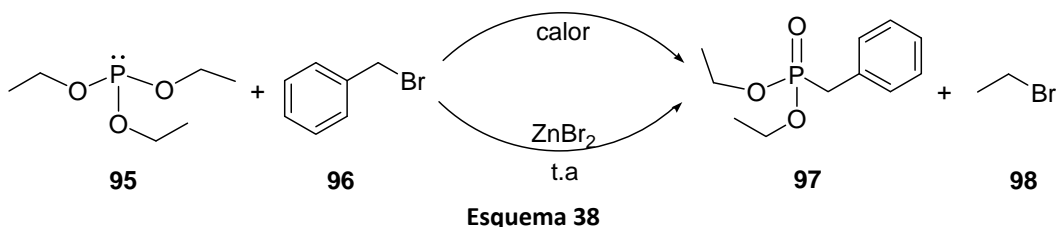
²¹⁷ Renard, P.; Vayron, P.; Leclerc, E.; Valleix, A.; Mioskowski, C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 2389-2392.

²¹⁸ Rajeshwaran, G.G.; Nandakumar, M.; Sureshbabu, R.; Mohanakrishnan, A.K. *Org. Lett.*, **2011**, 13, 1270-1273.



Sobre este proceso se encuentran descritos algunos estudios mecanísticos y aunque el intermedio **93** ha sido aislado en condiciones experimentales particulares, no se puede descartar la formación de un intermedio pentacoordinado **94** (esquema 37). Adicionalmente, cuando se trata de la reacción catalizada a través de halogenuros de Zn, no se conoce muy bien si la reacción ocurre por un mecanismo bimolecular S_N2 o uno unimolecular S_N1 . En general, existe una falta de datos sobre la formación y naturaleza de los intermedios participantes en la reacción. Por esta razón, se puede afirmar una vez más que la UF-NMR puede ofrecer la posibilidad de aportar detalles de este proceso.

Así pues, se decidió estudiar en tiempo real, mediante la secuencia 2D ^1H , ^{31}P UF-HMBC, la reacción de Michaelis-Arbuzov entre el fosfito de trietilo **95** y el bromuro de bencilo **96**, en presencia y ausencia del catalizador bromuro de zinc (ZnBr_2), para formar el fosfonato de dietilbencilo **97** y bromuro de etilo **98** (Esquema 38).



Se realizó un estudio preliminar de la reacción mediante experimentos de 1D y 2D de RMN tradicional. En la Figura 5.4 se observa un espectro 2D HMBC ^1H , ^{31}P de la mezcla de reacción, que permite comprobar la posición tanto de las señales de correlación ^1H , ^{31}P a 3.25/141.1 ppm (círculo rojo), correspondientes al P(III) y al grupo etilo del fosfito de trietilo, así como del fosfonato de dietilbencilo final a 3.38/28.2 ppm, propias del P(V) y el grupo etilo (círculos azul), y a 2.52/28.2 ppm, debida al mismo fosforo y el metileno procedente del bromuro de bencilo (círculo verde). De esta forma se ha obtenido información inequívoca acerca de los rasgos estructurales del reactivo inicial, producto final y de las posibles especies intermedias que se formen a lo largo del proceso y que serán monitorizados a través del experimento dinámico de UF-NMR. Adicionalmente, con ello se han establecido las condiciones experimentales adecuadas para llevar a cabo el estudio sobre la reacción de Michaelis-Arbuzov.

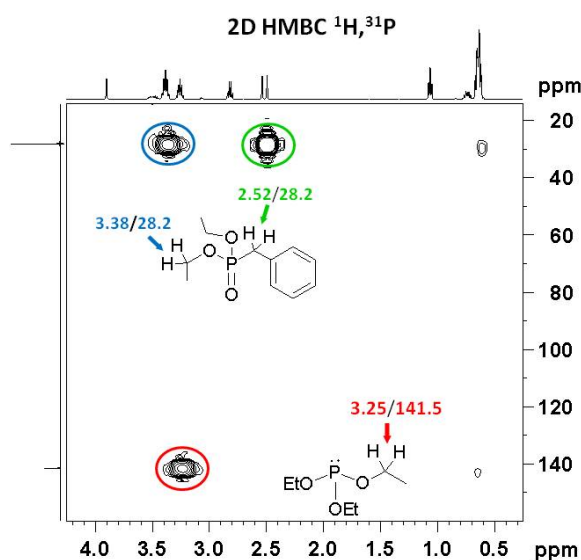


Figura 5.4. Espectro 2D ^1H , ^{31}P HMBC tradicional de la mezcla de reacción entre el bromuro de bencilo y el fosfito de trietilo, obtenido en 30 min.

La secuencia 2D ^1H , ^{31}P UF-HMBC empleada ha sido desarrollada en nuestro grupo de investigación²¹⁹ y tal cómo se muestra en la Figura 5.5, se basa en el programa de pulsos 2D UF-HSQC de codificación espacial modulada en amplitud. Ella está diseñada en modo dinámico, es decir que se repite secuencialmente a lo

²¹⁹ Fernández-Valle, M.E. *Avances en Resonancia Magnética Nuclear Ultrarrápida*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Septiembre de 2013.

largo del seguimiento. Su particularidad es el tiempo de espera d , el cual es de 31.25 ms con el fin de monitorizar los acoplamientos a dos y tres enlaces (2J y 3J), así como el hecho de que durante la adquisición, no se conecta el desacoplador, tal y como ocurre con la secuencias tradicionales de HMBC de correlación 1H , ^{31}P .

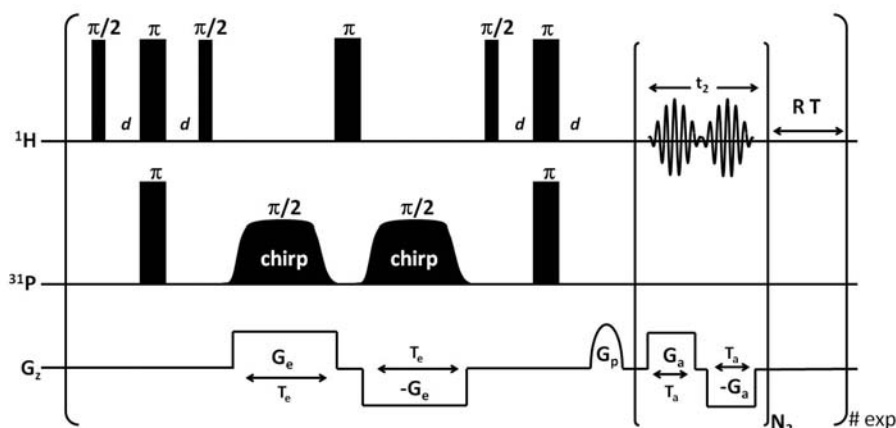


Figura 5.5. Secuencia 2D 1H , ^{31}P UF-HMBC dinámica, empleada en el seguimiento en tiempo real de la reacción de Michaelis-Arbuzov.

La reacción se realiza en el interior de un espectrómetro 500 MHz, equipado con una sonda de RF BBO. Para la adición de los reactivos desde el exterior del equipo al interior del tubo de RMN se emplea el sistema de inyección descrito en el apartado VI.3.

5.2.1. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en ausencia de ácido de Lewis

El estudio se inicia con la reacción en ausencia de catalizador. Para este caso se requiere un rango espectral en el canal de fósforo de al menos 140 ppm (Figura 5.4). Sin embargo, como se ha mencionado en repetidas ocasiones, la UF-NMR presenta importantes limitaciones cuando se trata de cubrir grandes zonas espectrales (apartado II.4.1) y por tanto decidimos barrer dos ventanas diferentes, cada una de 4.0 ppm en 1H y de 60.0 ppm en ^{31}P aproximadamente. Ello se logra aplicando alternativamente la secuencia UF-HMBC con distinto offset de la frecuencia en la dimensión indirecta (la dimensión del ^{31}P).

El **rango espectral A** comprende de 0.25 a 4.25 ppm en ^1H y desde -3.9 a 66.1 ppm en ^{31}P . El **rango espectral B** cubre el mismo rango en ^1H y va de 108.9 hasta 173.1 ppm en ^{31}P . Ello permite realizar el seguimiento sobre las zonas en donde se esperan las señales de correlación tanto de los reactivos y el producto final, como de las posibles especies intermedias que se formen.

Para este caso, dentro del tubo de RMN se dispone el fosfito de trietilo **95** y tetracloroetano- d_2 (TCE- d_2) como disolvente, el cual permite subir la temperatura hasta 70°C sin problemas de evaporación. Dentro de la cánula del sistema de inyección se dispone una disolución de bromuro de bencilo **96** y TCE- d_2 . Una vez ensamblada la cánula dentro del tubo de RMN, éste se introduce en el equipo, se gradúa la temperatura a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del bromuro de bencilo. Para el seguimiento de la reacción se registraron 112 espectros 2D $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ UF-HMBC en un total de 64.90 min. Cada experimento está adquirido con 2 *scans*; el primer rango espectral requiere 10.32 s, mientras que el segundo necesita 14.32 s debido a que en esta ventana se realiza la presaturación de las señales dobladas del producto final. Esto implica que se realizan dos espectros de UF-HMBC en un tiempo total de 37.77 s, que incluye el tiempo de repetición TR de 10 s entre cada rango espectral. Los datos experimentales, así como los parámetros de adquisición optimizados se han incluido en el apartado VI.8.1

En la Figura 5.6 se muestran algunos espectros 2D $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ UF-HMBC representativos de diferentes instantes de la reacción para los dos rangos espectrales. En el **rango espectral A**, a 2.57 min después de haber realizado la inyección, se empiezan a observar las correlaciones correspondientes al fosfonato de dietilbencilo (flecha **verde** y **azul**). Estas señales se intensifican en el transcurso de la reacción y permanecen hasta el final. Veinticuatro horas después de haber comenzado el experimento, se ha comprobado que el producto de partida ha desaparecido completamente, mientras que en el sistema sólo se observa el producto final.

En el **rango espectral B**, se observa la señal de correlación perteneciente al fosfito de trietilo (flecha **roja**), la cual va disminuyendo de intensidad a medida que avanza el experimento.

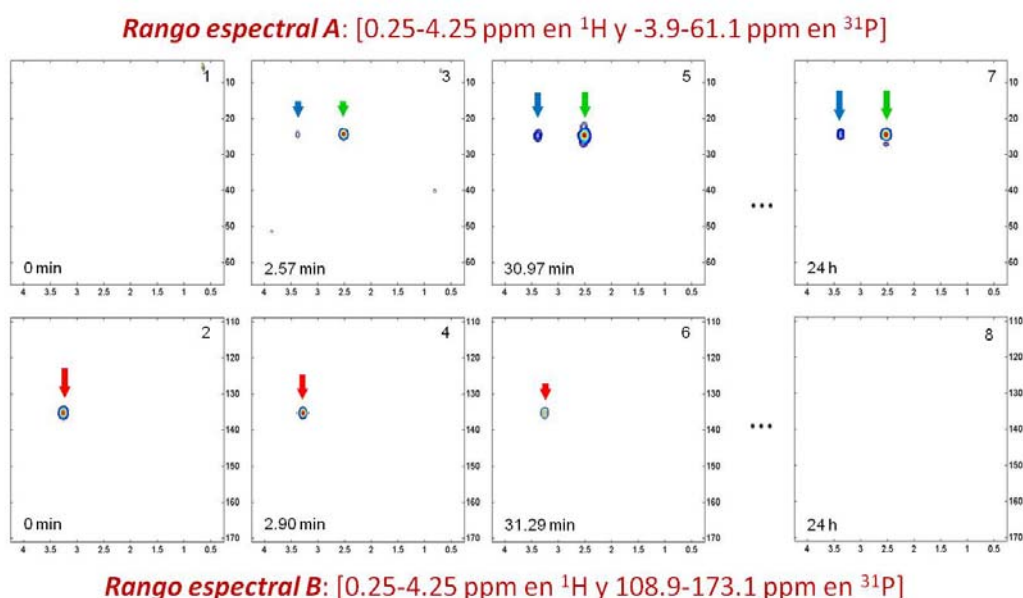


Figura 5.6. Espectros representativos de cada uno de los rangos espectrales estudiados para el seguimiento de la reacción entre el bromuro de bencilo y fosfito de trietilo, en **ausencia de bromuro de zinc**. La reacción se lleva a cabo en $\text{TCE-}d_2$ y a 298 K. Las señales de correlación marcadas en colores representan los productos inicial (**rojo**) y final (**verde y azul**).

Así pues, en ausencia del catalizador se observan exclusivamente las señales de correlación pertenecientes a los productos inicial y final. No se evidencia la formación de especie intermedia alguna, indicando con ello que seguramente esta reacción transcurre a través de un mecanismo bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$).

5.2.2. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en presencia de ácido de Lewis

En el caso de la reacción de Michaelis-Arbuzov en presencia de bromuro de zinc (ZnBr_2) como catalizador del proceso, se trabaja con un único rango espectral de aproximadamente 4.0 ppm en ^1H y 42.0 ppm en ^{31}P . Esto se debe a que el fosfito

de trietilo **95** inicial se compleja con el ácido de Lewis, y la correlación que antes se observaba a 3.25–141.5 ppm en el *rango espectral A* desaparece.

Dentro del tubo de RMN se dispone el fosfito de trietilo **95**, ZnBr_2 y $\text{TCE-}d_2$ como disolvente. Dentro de la cánula del sistema de inyección se dispone una disolución de bromuro de bencilo **96** y $\text{TCE-}d_2$. Una vez ensamblada la cánula dentro del tubo de RMN, éste se introduce en el equipo, se gradúa la temperatura a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del bromuro de bencilo. En total se registraron 800 espectros 2D ^1H , ^{31}P UF-HMBC en un tiempo total de 273.47 min. Cada experimento está adquirido con 2 *scans*, y requiere de 20.51 s incluyendo el tiempo de repetición TR de 5 s. Los datos experimentales, así como los parámetros de adquisición optimizados se han incluido en el apartado VI.8.2

En la Figura 5.7 se muestran algunos espectros 2D ^1H , ^{31}P UF-HMBC representativos de diferentes instantes de esta reacción. El rango espectral comprende desde 0.25-4.25 ppm en ^1H y de 14.3-55.7 ppm en ^{31}P .

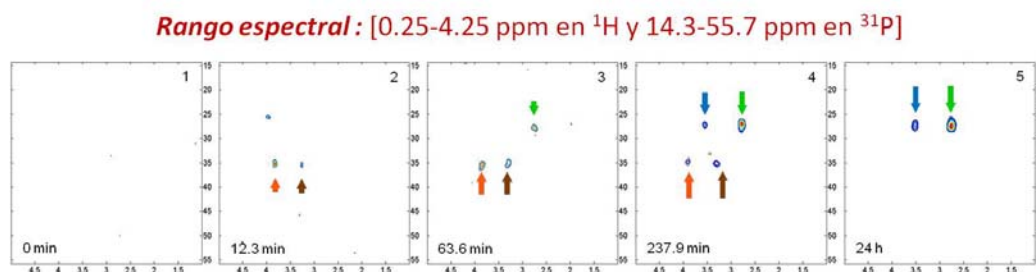


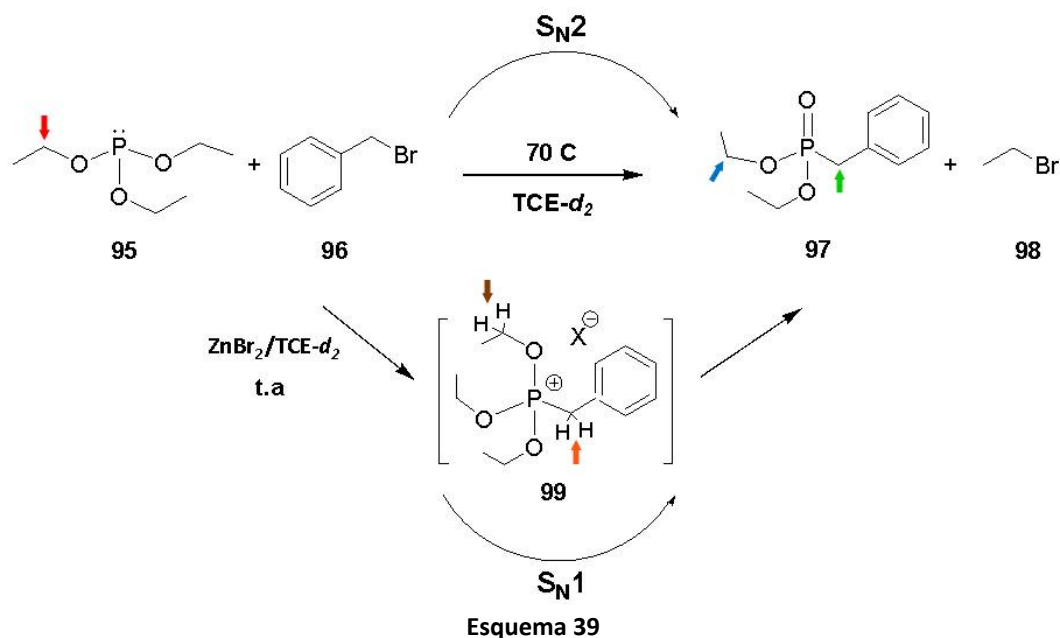
Figura 5.7. Espectros representativos del seguimiento de la reacción entre el bromuro de bencilo y fosfito de trietilo, en **presencia de ZnBr_2** . La reacción se lleva a cabo en $\text{TCE-}d_2$ y a 298 K. Las correlaciones marcadas en colores representan la especie intermedia formada (**marrón y naranja**), así como el producto final del proceso (**verde y azul**).

En los primeros instantes de la reacción, en la zona espectral estudiada no se observa especie alguna, como era de esperar. A partir del minuto 12.3 empiezan a aparecer una pareja de nuevas señales de correlación a 3.25/41.6 y 3.90/41.6 ppm (flechas **marrón** y **naranja** respectivamente), cuya intensidad va en

aumento, pero que al final del experimento empieza a disminuir, hasta desaparecer completamente tras 24 horas. Además, a partir del minuto 63.6 se empiezan a observar las correlaciones pertenecientes al dietilbencilfosfonato **97** a 2.73/30.2 y 3.47/ 30.2 ppm (flechas **verde** y **azul**), cuyas señales aparecen ligeramente más apantalladas, tanto en ^1H como en ^{31}P , en relación a las mismas señales observadas para el proceso ejecutado en ausencia del ZnBr_2 .

Estos resultados indican la formación de una especie iónica intermedia en el proceso. Los desplazamientos químicos observados se corresponden con los de una especie catiónica como la del bromuro de benciltrietoxifosfonio **99**, mostrada en el Esquema 39. No se aprecia aquí la aparición de señales de correlación previas en los primeros estadios de la reacción, que pudieran provenir de especies complejas fosfito de trietilo/bromuro de bencilo, como sucede en otras reacciones que transcurren con desarrollo de carga, estudiadas por nosotros mediante UF-NMR. Tampoco se han detectado señales provenientes de especies formadas con posterioridad al intermedio **99**.

El Esquema 39 recoge el mecanismo propuesto para esta reacción a partir de las evidencias espectroscópicas encontradas.



Estos datos confirman el mecanismo unimolecular (S_N1) propuesto en la bibliografía para la reacción de Michaelis-Arbuzov catalizada mediante un ácido de Lewis, con la formación intermedia de una sal de fosfonio con la suficiente estabilidad como para ser detectada durante un extenso periodo de tiempo, gracias a la presencia del $ZnBr_2$.²²⁰ Los desplazamientos químicos observados de este intermedio se encuentra en buena concordancia con propuestas bibliográficas realizadas con anterioridad para este tipo de especies iónicas de fósforo.^{221,222}

Por tanto, es posible concluir que la secuencia 2D $^1H, ^{31}P$ UF-HMBC puede ofrecer una información directa y precisa sobre los cambios estructurales en el centro de la reacción (átomo de ^{31}P), así como en los núcleos enlazados en las posiciones vecinas, dando con ello una evidencia clara de la formación del intermedio salino bromuro de benciltrietoxifosfonio **99**, tal como se había propuesto en la literatura y permitiendo con ello aportar nuevos datos acerca del mecanismo por el cual transcurre esta reacción en presencia de ácidos de Lewis.

Finalmente, es de destacar que por primera vez se ha llevado a cabo un estudio ultrarrápido dinámico de ^{31}P , extendiendo con ello las posibilidades de seguimiento de diferentes reacciones orgánicas. La secuencia 2D $^1H, ^{31}P$ UF-HMBC es pues una herramienta útil en la monitorización de este tipo de sistemas dinámicos como es la reacción de Michaelis-Arbuzov.²²³

El resumen de los resultados obtenidos en el Capítulo 5 se recoge seguidamente en el apartado V. CONCLUSIONES.

²²⁰ Rajeshwaran, G.G.; Nandakumar, M.; Sureshbabu, R.; Mohanakrishnan, A.K. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 1270-1273.

²²¹ Colle, K.S.; Lewis, E.S. *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 571-574.

²²² Köhl, O. *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy*; Springer: Greifswald, Alemania, 2008.

²²³ Fernandez-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z.D.; Sáez, E.; Herrera, A. $^1H, ^{31}P$ UF-HMBC: a Useful Tool for Real Time Monitoring of Michaelis-Arbuzof Reaction. Presentada en SMASH 2013 NMR Conference, Santiago de Compostela, España, Septiembre 22-25, 2013; Poster 66.

V. Conclusiones

Conclusiones

El desarrollo de esta Tesis se ha centrado en la aplicación de la novedosa técnica de RMN ultrarrápida al estudio de sistemas dinámicos en tiempo real y en concreto a las reacciones orgánicas. Para ello, ha sido precisa la optimización de los experimentos de UF-NMR y de las condiciones experimentales de las reacciones estudiadas. Se han conseguido observar cambios estructurales durante el transcurso de los procesos objeto de estudio, la detección de intermedios nunca antes observados, e incluso obtener una aproximación cualitativa de la cinética de dichos procesos. Todo ello ha permitido extraer importantes conclusiones acerca de los mecanismos de reacción implicados mediante el seguimiento de correlaciones homo $^1\text{H}, ^1\text{H}$ (UF-TOCSY) y heteronucleares tanto de $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$, como de $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ (UF-HSQC, UF-HSQC Selectivo, UF-HMBC), e incluso a través de una combinación de ellas (UF-TOCSY-HMBC).

En resumen, se han podido proporcionar pautas experimentales que acercan la aplicación de esta técnica de RMN al estudio de reacciones y sistemas reales. Todo ello se ha llevado a cabo en el espectrómetro de 500 MHz del CAI de RMN y RSE de la UCM.

En el Capítulo 1 se han abordado algunos problemas experimentales que se derivan de características intrínsecas de la técnica de UF-NMR, como lo son su baja sensibilidad y el necesario dominio de los gradientes de campo de magnético. Los resultados conseguidos permiten concluir que:

- La concentración límite que permite obtener espectros de correlación homonuclear 2D UF-COSY y 2D UF-TOCSY en un solo *scan* ($ns=1$) y en condiciones de relación S/R adecuadas, es 20 mM.
- La concentración límite con la que se ha obtenido espectros de correlación heteronuclear 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ UF-HSQC en dos *scans* ($ns=2$) y en condiciones de relación S/R adecuadas, es de 300 mM, mientras que para espectros 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ UF-HMBC es de 500 mM. En los espectros análogos de correlación heteronuclear 2D $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ UF-HMBC, es de 50 mM.

- La intensidad máxima del gradiente de campo generado en este equipo en concreto (500 MHz), es inferior al valor que indica la casa comercial (53.5 G/cm). La diferencia entre el gradiente G_z real calculado y el gradiente G_z teórico crece cuanto mayor es el porcentaje de intensidad del gradiente aplicado. Debido a ello, la calibración de la escala de los espectros de UF-NMR en la dimensión indirecta, se ha realizado mediante la utilidad diseñada para tal fin, la cual se incluye en el programa de procesamiento **XprocUFnmr** desarrollado en nuestro grupo.

En el Capítulo 2 se ha abordado la aplicación de la secuencia de correlación homonuclear 2D UF-TOCSY modulada en amplitud, al estudio en tiempo real de la reacción de la 3-pentanona con anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 , que da lugar a la 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina- d_6 como producto principal. Cabe destacar los siguientes aspectos:

- La reacción se ha llevado a cabo en el interior de un tubo de RMN de 5 mm. Se han registrado 525 espectros 2D UF-TOCSY en un tiempo de 87.53 min, a partir de los cuales se puede seguir el transcurso de la reacción.
- Se han obtenido por primera vez datos espectroscópicos acerca de la presencia de diferentes especies catiónicas intermedias. Su asignación estructural se ha contrastado mediante modelización con el programa Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8. Los valores de desplazamientos químicos calculados se encuentran en muy buena concordancia con los observados.
- Ha sido posible obtener datos cinéticos del proceso estudiado, lo que aporta una información valiosa relativa a la concentración de las especies participantes y que permite calcular el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de cada intermedio.
- Estos resultados permiten explicar satisfactoriamente el mecanismo propuesto con anterioridad, poniendo de manifiesto las idóneas características de la UF-NMR para la monitorización de reacciones orgánicas.

En el Capítulo 3 se ha abordado la utilización de secuencias de correlación heteronuclear moduladas en amplitud 2D UF-HSQC estándar, UF-HMBC de doble ventana y UF-HSQC Selectivo, esta última desarrollada en colaboración con el grupo del Prof. Lucio Frydman. Se han aplicado respectivamente al estudio en tiempo real, de la reacción de la acetofenona, marcada isotópicamente con ^{13}C , en posiciones α y β y en abundancia natural, con anhídrido triflico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 , para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 . Como resumen se puede destacar que:

- Mediante la secuencia 2D UF-HSQC estándar, se ha realizado la monitorización de la reacción de la acetofenona- β - ^{13}C , que da lugar a la 2,4-dimetil-5- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 . Se han registrado 500 espectros en un tiempo de 85.35 min. A través de la secuencia 2D UF-HMBC de doble ventana, se ha estudiado la reacción con la acetofenona- α - ^{13}C , que conduce a la 2,4-dimetil-6- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 como producto principal. En este caso se han obtenido 219 espectros por cada ventana espectral estudiada, en un tiempo de 112 min.
- La monitorización de la reacción de la acetofenona en condiciones de abundancia natural, que da lugar a 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina- d_6 como producto principal, se ha realizado en un equipo de RMN Varian, de 600 MHz. Se han registrado 500 espectros 2D UF-HSQC Selectivos con 12 *scans* por cada ventana espectral estudiada, en un tiempo total de 432.6 min.
- La aplicación de las secuencias de correlación heteronuclear 2D UF-HSQC estándar, UF-HMBC de doble ventana y UF-HSQC Selectivo, ha permitido encontrar información directa acerca de los cambios que tienen lugar en el propio núcleo del carbono carbonílico de la acetofenona de partida y de su evolución a través de diferentes intermedios alifáticos y olefínicos. Se ha confirmado la asignación estructural de todas las especies detectadas empleando el programa de modelización Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8 y mediante cálculos más complejos realizados con un conjunto de programas Gaussian 09 y el método GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G*. Los valores de los desplazamientos químicos observados se encuentran en muy buena concordancia con los valores calculados.

- Ha sido posible obtener datos cinéticos a partir de los diferentes procesos estudiados, lo que aporta una información valiosa relativa a la concentración de las especies participantes en la reacción.
- Los datos obtenidos han permitido establecer de manera clara dos vías mecanísticas, a través de las cuales esta reacción tiene lugar, denominadas respectivamente **ruta alifática** y **ruta olefínica**. Los resultados muestran la idoneidad de la técnica UF-NMR de acoplamiento heteronuclear como método para el seguimiento de reacciones orgánicas en tiempo real y el estudio de los mecanismos de reacción implicados.

En el Capítulo 4 se ha estudiado la aplicación de una secuencia combinada de correlación homo y heteronuclear 2D UF-TOCSY-HMBC modulada en amplitud y desarrollada en nuestro grupo de trabajo, al estudio de la monitorización en tiempo real de la reacción de la ciclohexanona- α - ^{13}C , con anhídrido trifílico (Tf_2O) en presencia de acetonitrilo- d_3 , para dar lugar a la formación de la 2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahidroquinazolina- d_6 . Cabe mencionar aquí que:

- Se han barrido dos rangos espectrales diferentes y para cada uno de ellos se han registrado en total 500 espectros UF-TOCSY y UF-HMBC en un tiempo de 4.96 horas.
- A través de la secuencia combinada 2D UF-TOCSY-HMBC se han podido detectar las señales de cruce de una nueva especie intermedia, de carácter no iónico. Para la asignación estructural de todas las especies posibles, se ha empleado el programa de modelización Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) V8 y de manera más exhaustiva, un conjunto de programas Gaussian 09 y el método GIAO-PCM-M06-2X/6-31+G*. Los valores de los desplazamientos químicos observados se encuentran en muy buena concordancia con los calculados.
- Se ha comprobado que los experimentos UF-TOCSY reflejan cambios muy rápidos en el progreso de la reacción, mientras que en los experimentos UF-HMBC los cambios necesitan de un periodo de tiempo más dilatado, debido a la diferencia de sensibilidad de ambas técnicas. La secuencia UF-HMBC presente en el bucle, ofrece información sobre el número y tipo de

especies diferentes a lo largo del sistema estudiado, mientras que la secuencia UF-TOCSY proporciona detalles estructurales complementarios para cada una de las especies anteriormente detectadas. Con todo ello, se puede afirmar que el bucle UF-TOCSY-HMBC constituye una perfecta combinación de técnicas ultrarrápidas para la determinación estructural dinámica.

- Los resultados obtenidos han permitido proponer una alternativa mecanística para la formación de pirimidinas a partir de cetonas cíclicas. Las características estructurales de dichas cetonas parecen desfavorecer la formación de intermedios iónicos estables (como en los casos anteriores). Para este sistema, se puede concluir que los habituales intermedios iónicos no llegan a la concentración crítica mínima para ser observados mediante UF-NMR.
- Ha sido posible obtener datos cinéticos del proceso estudiado que proporciona una valiosa información relativa a la concentración de las especies participantes, así como de sus tiempos de vida media ($t_{1/2}$).
- Finalmente estos resultados confirman, una vez más, que la metodología de UF-NMR, aplicada al seguimiento del acoplamiento tanto homo como heteronuclear constituye un método eficaz para la monitorización de reacciones orgánicas en tiempo real y la posterior elucidación de sus mecanismos de reacción.

En el Capítulo 5 se ha abordado la aplicación de secuencias de UF-NMR a diferentes reacciones orgánicas en tiempo real, como los son la reacción de Diels-Alder o la de Michaelis-Arbuzov. Las conclusiones más importantes son las siguientes:

- Se ha llevado a cabo el seguimiento en tiempo real de la reacción de cicloadición entre el 1,2,3,4,5-pentametilciclopentadieno y el fumarato de dietilo, para dar lugar a la formación del aducto 1,4,5,6,7-pentametilbicyclo [2.2.1] hept-5-ene-2,3-dicarboxilato de dietilo, mediante la aplicación de la secuencia de correlación homonuclear 2D UF-TOCSY. La reacción se ha llevado a cabo en el interior de un tubo de RMN de 5 mm y se han registrado 993 espectros en un tiempo de 104.83 min.

- En las condiciones de reacción ensayadas, la secuencia 2D UF-TOCSY también es aplicable a la monitorización de un sistema dinámico sin desarrollo de carga, en el que no participan especies intermedias dado su carácter concertado. Con ella es posible observar en tiempo real la evolución de reactivos a productos, si bien no se han observado datos acerca de la interacción de los reactivos.
- Por primera vez se ha llevado a cabo un estudio ultrarrápido dinámico mediante ^{31}P -RMN. Se ha llevado a cabo el seguimiento en tiempo real mediante la secuencia 2D $^1\text{H},^{31}\text{P}$ UF-HMBC, de la reacción Michaelis-Arbuzov entre el fosfito de trietilo y el bromuro de bencilo, en presencia y ausencia de bromuro de zinc (ZnBr_2) como catalizador, para formar el fosfonato de dietilbencilo. La secuencia 2D $^1\text{H},^{31}\text{P}$ UF-HMBC puede ofrecer una información directa y precisa sobre los cambios estructurales en el centro de la reacción (átomo de ^{31}P), así como en los núcleos que se encuentran en las posiciones vecinas. En este caso ello ha permitido encontrar evidencia en tiempo real de la formación de una sal de fosfonio intermedia cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de ZnBr_2 .
- La secuencia empleada es pues una herramienta para la monitorización de sistemas dinámicos como es el caso de la reacción de Michaelis-Arbuzov.

Las conclusiones presentadas en esta Tesis son el resultado de aplicar a sistemas reales las prometedoras posibilidades analíticas que proporciona la técnica UF-NMR.

VI. Parte experimental

VI.1. Límites de detección

VI.1.1 Límites de detección de las secuencias de acoplamiento escalar homonuclear UF-COSY y UF-TOCSY

Los espectros UF-COSY y UF-TOCSY adquiridos para determinar el límite de detección de estas secuencias se han obtenido a 500 MHz con diferentes muestras de estricnina en CDCl_3 de concentraciones 80, 40 y 20 mM. Estas han sido preparadas respectivamente a partir de 13.4, 6.7 y 3.4 mg de estricnina comercial, en 0.5 mL del disolvente.

Los espectros **UF-COSY A.M.** (modulados en amplitud) se han adquirido con la secuencia **uftocsy.ucm**. Sus parámetros de adquisición optimizados son: ancho de banda del pulso *chirp*, $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; intensidad del gradiente de codificación espacial, $G_e=7.49$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=10$ ms; intensidad del gradiente durante la adquisición, $G_a=24.08$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=210$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=128$; el tiempo de estabilización de los gradientes es de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1=4.7$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.0$ ppm (estos valores son posteriores a la calibración de los experimentos, la cual se realiza durante el procesamiento de los espectros). La potencia del pulso *chirp* empleado fue de 28 dB y el offset de -1800 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μs ; se emplea un tiempo de secuencia DIPSI o tiempo de mezcla $d_9=20$ ms. Los experimentos se han obtenido con un único *scan*, $ns=1$, hasta llegar a una concentración de 20 mM. Por debajo de ella, se requieren como mínimo dos barridos para obtener un espectro en condiciones de relación S/R adecuadas. El tiempo total de adquisición con $ns=1$ fue de 1.16 s, incluyendo el tiempo TR de 1 s.

Los espectros **UF-COSY C.T.** (a tiempo constante) se han adquirido con la secuencia **ufcosyCT.ucm**. Sus parámetros de adquisición optimizados son: ancho de banda del pulso *chirp*, $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; intensidad del gradiente de codificación espacial, $G_e=7.49$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=10$ ms; intensidad del gradiente durante la adquisición, $G_a=37.45$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=238$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=128$; el tiempo de estabilización de los gradientes es de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1=4.1$ ppm y en F_2 , $SW_2=3.6$ ppm (estos valores son posteriores a la calibración de los experimentos,

la cual se realiza durante el procesamiento de los espectros). La potencia del pulso *chirp* empleado fue de 18 dB y el offset de -1250 Hz.; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μ s. Los experimentos se han obtenido en un único *scan*, $ns=1$, hasta llegar a la concentración de 20 mM. Por debajo de ella, se requieren como mínimo dos barridos para obtener un espectro en condiciones de relación S/R adecuadas. El tiempo total de adquisición con $ns=1$ fue de 1.19 s, incluyendo el tiempo TR de 1 s.

Los espectros **UF-TOCSY A.M.** (modulados en amplitud) se han adquirido con la secuencia ***uftocsy.ucm***. Sus parámetros de adquisición optimizados son: ancho de banda del pulso *chirp*, $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; intensidad del gradiente de codificación espacial, $G_e= 7.49$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=10$ ms; intensidad del gradiente durante la adquisición, $G_a=24.08$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=210$ μ s; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2= 128$; el tiempo de estabilización de los gradientes es de 40 μ s. Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1=4.7$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.0$ ppm (estos valores son posteriores a la calibración de los experimentos, la cual se realiza durante el procesamiento de los espectros). La potencia del pulso *chirp* empleado fue de 28 dB y el offset de -1800 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μ s. En este caso se emplea un tiempo de secuencia DIPSI o tiempo de mezcla variable, $d_9= 60, 80, 90$ y 100 ms. Los experimentos se han obtenido en un único *scan*, $ns=1$, hasta llegar a una concentración de 20 mM. Por debajo de ella, se requieren como mínimo dos barridos para obtener un espectro en condiciones de relación S/R adecuadas. El tiempo total de adquisición con $ns=1$ y $d_9=80$ ms fue de 1.22 s, incluyendo el tiempo TR de 1 s.

Los espectros **UF-TOCSY C.T.** (a tiempo constante) se han adquirido con la secuencia ***uftocsyCT.ucm***. Sus parámetros de adquisición optimizados son: ancho de banda del pulso *chirp*, $\Delta\Omega_{RF}=60$ kHz; intensidad del gradiente de codificación espacial, $G_e= 7.49$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=10$ ms; intensidad del gradiente durante la adquisición, $G_a=37.45$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=238$ μ s; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2= 128$; el tiempo de estabilización de los gradientes es de 40 μ s. Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1=4.1$ ppm y en F_2 , $SW_2=3.6$ ppm (estos valores son posteriores a la calibración de los experimentos, la cual se

realiza durante el procesamiento de los espectros). La potencia del pulso *chirp* empleado fue de 18 dB y el offset de -1250 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μ s. En este caso se emplea un tiempo de secuencia DIPSI o tiempo de mezcla variable, $d_9=60, 80, 90$ y 100 ms. Los experimentos se han obtenido en un único *scan*, $ns=1$, hasta llegar a una concentración de 20 mM. Por debajo de ella, se requieren como mínimo dos barridos para obtener un espectro en condiciones de relación S/R adecuadas. El tiempo total de adquisición con $ns=1$ y $d_9=80$ ms fue de 1.26 s, incluyendo el tiempo TR de 1 s.

En la Tabla 1.2 y 1.3 se muestran los espectros UF-COSY (A.M. y C.T.) y los espectros UF-TOCSY (A.M. y C.T.) obtenidos. El procesamiento de todos estos experimentos es similar: se realiza con 96 puntos y un llenado con ceros previo a la transformada de Fourier tanto en la dirección t_1 , como en la dirección t_2 . Se suman los espectros obtenidos mediante los datos adquiridos con los gradientes positivos y negativos, además de aplicar un filtro sinusoidal en la dirección t_2 .

VI.1.2 Límites de detección de las secuencias de acoplamiento escalar heteronuclear UF-HSQC y UF-HMBC

Correlaciones $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$: Los espectros UF-HSQC y UF-HMBC adquiridos para determinar el límite de detección de estas secuencias, se han obtenido a 500 MHz empleando diferentes muestras patrón de 1-clorobutano (BuCl) de 1000, 500 y 300 mM en CDCl_3 . Estas muestras han sido preparadas respectivamente a partir de 44.3, 22.2 y 13.9 mg de BuCl grado comercial, en 0.5 mL del disolvente.

Los espectros **UF-HSQC A.M.** (modulados en amplitud) se han adquirido con la secuencia ***ufhsqc.ucm***. Sus parámetros de adquisición optimizados son: ancho de banda del pulso *chirp*, $\Delta\Omega_{RF}=50$ kHz; intensidad del gradiente de codificación espacial, $G_e=26.75$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=2.5$ ms; intensidad del gradiente durante la adquisición, $G_a=24.08$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=210$ μ s; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=128$; el tiempo de estabilización de los gradientes es de 40 μ s. Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1=70.3$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.0$ ppm (estos valores son posteriores a la calibración de los experimentos, la cual se realiza durante el procesamiento de los espectros). La potencia del pulso *chirp* empleado fue de 32 dB y el offset de -7500Hz, previo a la adquisición se aplicó un

gradiente de purga, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μ s. El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=1.72$ ms permite la detección de los acoplamientos a 140 Hz; durante la adquisición se emplea un bloque de desacoplamiento GARP durante 80 μ s, con una potencia de 23 dB.

Las secuencias de acoplamiento heteronuclear UF-HSQC y UF-HMBC requieren siempre la adquisición de un mínimo de dos *scans*, $ns=2$, con el fin de eliminar las correlaciones de ^1H con el ^{12}C presentes en sus espectros. En cada *scan* la fase del primer pulso *chirp* varía en 180° , a la vez que se desplaza la fase del receptor que está en concordancia con la fase del primer pulso de excitación. Los experimentos UF-HSQC se han obtenido con dos *scans*, hasta llegar a una concentración de 300 mM. Por debajo de ella, se requieren como mínimo cuatro barridos para obtener un espectro en condiciones de relación S/R adecuadas. El tiempo total de adquisición con $ns=2$ fue de 20.34 s, incluyendo el tiempo TR de 10 s.

Los espectros **UF-HMBC A.M.** (modulados en amplitud) se han adquirido con la secuencia ***ufhsqc.ucm***. Sus parámetros de adquisición optimizados son: ancho de banda del pulso *chirp*, $\Delta\Omega_{RF}=50$ kHz; intensidad del gradiente de codificación espacial, $G_e=26.75$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=2.5$ ms; intensidad del gradiente durante la adquisición, $G_a=24.08$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=210$ μ s; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=128$; el tiempo de estabilización de los gradientes es de 40 μ s. Estos parámetros proporcionan la siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1=70.3$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.0$ ppm (estos valores son posteriores a la calibración de los experimentos, la cual se realiza durante el procesamiento de los espectros). La potencia del pulso *chirp* empleado fue de 32 dB y el offset de -7500 Hz. Previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μ s. La diferencia radica en el intervalo del bloque INEPT, el cual varía entre 25.0, 27.7 y 31.25 ms para permitir la detección de los acoplamientos de 10, 9 y 8 Hz respectivamente; durante la adquisición se emplea un bloque de desacoplamiento GARP durante 80 μ s, con una potencia de 23 dB. Los experimentos UF-HMBC se han obtenido en dos *scans*, $ns=2$, hasta llegar a la concentración de 500 mM. Por debajo de ella, se requieren como mínimo cuatro barridos para obtener un espectro en condiciones de relación S/R adecuadas. El

tiempo total de adquisición con $ns=2$ y $d_4=27.8$ ms, para una $J=9$ Hz, fue de 20.54 s, incluyendo el tiempo TR de 10 s.

Correlaciones ^1H , ^{31}P : Los espectros UF-HMBC adquiridos para medir el límite de detección de esta secuencia se han obtenido a 500 MHz con diferentes muestras de fosfonato de dietilbencilo (FDB) y clorofosfato de dietilo (CFDE) en proporciones 1:1 a diferentes concentraciones (100, 50 y 25 mM).

La muestra 100 mM se prepara a partir de 11.4 mg de FDB y 8.6 mg de CFDE en 0.5 mL del CDCl_3 . La muestra 50 mM, se prepara a partir de 5.7 mg de FDB y 4.3 mg de CFDE en 0.5 mL de CDCl_3 . La muestra 25 mM, se prepara a partir de 2.9 mg de FDB y 2.2 mg de CFDE en 0.5 mL del CDCl_3 .

Los espectros **UF-HMBC A.M.** (modulados en amplitud) se han adquirido con la secuencia *ufhsqc_nd.ucm*. Sus parámetros de adquisición optimizados son: ancho de banda del pulso *chirp*, $\Delta\Omega_{RF}=50$ kHz; intensidad del gradiente de codificación espacial, $G_e=14.98$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=3.5$ ms; intensidad del gradiente durante la adquisición, $G_a=32.01$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=182$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=128$; el tiempo de estabilización de los gradientes es de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1=41.0$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.5$ ppm (estos valores son posteriores a la calibración de los experimentos, la cual se realiza durante el procesamiento de los espectros). La potencia del pulso *chirp* empleado fue de 32 dB y el offset de -4750 Hz. Previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga, $G_p=5.35$ G/cm, durante un tiempo de 200 μs . El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=27.8$ ms, permite la detección de los acoplamientos de 9 Hz. Durante la adquisición no se aplicó desacoplamiento alguno. La presaturación de la señal a 3.17 ppm, se realiza mediante un pulso de onda continua de duración, $d_{29}=2$ s y potencia 50 dB. Los experimentos se han obtenido en dos *scans*, $ns=2$, hasta llegar a una concentración de 25 mM. Por debajo de ella, se requieren como mínimo cuatro barridos para obtener un espectro en condiciones de relación S/R adecuadas. El tiempo total de adquisición con $ns=2$ y $d_4=27.7$ ms, fue de 24.53 s, incluyendo el tiempo TR de 10 s.

VI.2. Calibración de los gradientes

En la Figura 1.2.b se observa la secuencia *eco de espín*, denominada **calibgp**, empleada para la calibración del modulo de gradientes. Esta secuencia emplea dos gradientes de campo de forma cuadrada; el primero de ellos se aplica entre el pulso de 90° y de 180° y el segundo tiene la misma intensidad que el primero, con el doble de duración y está activo durante el periodo de adquisición.

El disco de Teflón empleado ha sido fabricado por el Taller Mecánico de Apoyo a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid y se ha adaptado al diámetro de un tubo de 5 mm de RMN para un equipo de 700 MHz. Además, se ha practicado un agujero en el centro de la pieza, lo que permite evacuar las burbujas de aire generadas en el momento de la preparación de la muestra.

Los experimentos se han adquirido con 4096 puntos empleando un ancho espectral de 100000 Hz y los perfiles se obtienen procesando la fid con 16384 puntos en modo magnitud. Con ello, se obtiene un error de 6 Hz por punto y 1.43 G/cm en el valor de G_z calculado.

Las siguiente tabla muestra los datos obtenidos para la calibración de los gradientes, empleando un disco de 3.70 mm de espesor (Δ_z).

Tabla 1.7. Datos obtenidos en la calibración de los gradientes, para un disco de 3.70 mm

%	fracción	Δv (Hz) ± 6 Hz (Hz)	G_z cal. (G/cm) ± 1.43 G/cm cal. (G/cm)	G_{\max} cal. (G/cm)	G_z teór. (G/cm)
10	0.10	8531.00	5.42	54.15	5.35
20	0.20	16980.40	10.78	53.90	10.70
30	0.30	25175.30	15.98	53.27	16.05
40	0.40	33444.00	21.23	53.08	21.40

VI.3. Sistema de inyección

Para la adición de los reactivos desde el exterior del imán al interior del tubo de RMN, se ha desarrollado un sistema de inyección, que se muestra en la Figura 2.2 y que permite realizar la monitorización de un sistema dinámico desde los primeros instantes del proceso. Aunque se considera que presenta un tiempo “muerto” entre 1 y 2 segundos, éste es lo suficientemente corto como para permitir la detección de especies que se formen en los primeros instantes de la reacción.

Este dispositivo consiste en una cánula de teflón de 0.5 mm de diametro interno y 2 m de largo aproximadamente, la cual conecta por un extremo una jeringa con cierre *Luer* y por el otro el tubo de resonancia que se encuentra dentro del equipo. Con ayuda de la jeringa, se dispone dentro del capilar el reactivo que será inyectado. Los demás compuestos requeridos para la reacción se encuentran en el tubo de RMN, entre ellos el disolvente deuterado.

El tapón del tubo está horadado lo que permite el paso de la cánula y dentro del mismo, también se dispone de una arandela de teflón, para evitar los movimientos del sistema cuando se realiza la inyección.

Para evitar la mezcla de los reactivos antes de la inyección, dentro del capilar de teflón se introducen en el siguiente orden: 50 μL de disolvente deuterado, que permite que la presión se propague de manera uniforme a lo largo del capilar en el momento de la inyección y una burbuja de aire (aproximadamente de 10 μL o 1-2 cm de longitud); finalmente se introduce la solución con el reactivo a inyectar, seguida de otra burbuja de aire (20 μL o 3-4 cm aproximadamente), que evita que el reactivo caiga antes de tiempo, en caso de que la estanqueidad no fuera adecuada. En el tapón del tubo de resonancia se realizó otro orificio que permitirá que la presión no aumente cuando se introduzca el reactivo.

A lo largo del trabajo experimental de esta memoria, se ha procurado la optimización de la posición de la cánula dentro del tubo de RMN. Después de muchas pruebas se llega a la conclusión de que la mejor posición para la cánula se encuentra situándola dentro de la muestra presente en el tubo de RMN, pero en la parte superior de la misma (en la marca de 5/8 mm del medidor). Todo ello consigue que la mezcla y difusión de los reactivos se realice de la forma más centrada posible en la zona del tubo de RMN que es visible para la sonda e

intentando que la cánula no interfiera dentro del espacio de la muestra que se codificará espacialmente.

VI.4. Estudio mecanístico de la reacción de la 3-pentanona y anhídrido trifílico (Tf₂O) con acetonitrilo-*d*₃, mediante la aplicación de UF-TOCSY

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro de 500 MHz y una sonda de RF BBO. Se estudia la reacción de la 3-pentanona (100 mM) y el anhídrido trifílico (150 mM) en presencia de acetonitrilo-*d*₃, lo que conduce a la formación de la 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina-*d*₆ **54**.

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 7.4 µL de 3-pentanona en 0.5 mL de acetonitrilo-*d*₃ como disolvente. En el interior de la cánula de teflón, se cargan 17.4 µL de Tf₂O disueltos en 0.1 mL de acetonitrilo-*d*₃. El tubo y la cánula se introducen en el equipo y la temperatura se gradúa a 298 K.

La adquisición del experimento dinámico se inicia con antelación a la inyección del Tf₂O, de manera que se registran dos experimentos previamente. La adquisición continúa durante la inyección y reacción posterior. Aunque el tiempo necesario para la inyección no es mayor al tiempo que se necesita para adquirir un espectro, los artefactos producidos por la difusión de los reactivos y la inhomogeneidad de la muestra pueden apreciarse en los dos o tres primeros espectros. Tras éstos, la homogeneidad de la muestra se recupera casi en su totalidad y los efectos de la difusión dejan de ser importantes por lo que la resolución de los espectros es ya comparable a la de los experimentos estáticos.

En total se adquirieron 525 experimentos UF-TOCSY cada 10 segundos (TR), empleando la secuencia *uftocsyDYN.ucm*. Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp $\Delta\Omega_{RF}$ = 60 KHz; intensidad del gradiente de codificación G_e = 8 G/cm; tiempo total de codificación t_1^{max} = 20 ms; intensidad del gradiente de adquisición G_a = 20 G/cm; tiempo de adquisición T_a = 246 µs; número de pasos de la adquisición N_2 = 64; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 µs. Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , SW_1 = 3.63 ppm y en F_2 , SW_2 = 3.50 ppm. El gradiente de purga antes de la adquisición consistió en un gradiente con forma sinusoidal de intensidad G_p = 16 G/cm durante un tiempo de

200 μ s; la secuencia *spin-lock* se aplicó durante 20 ms; la potencia del pulso chirp es de 28 dB y el offset de -2200 Hz.

Los espectros mostrados en la Figura 2.3 se han procesado por separado empleando los mismos parámetros. No se ha realizado ningún ajuste de *shearing*, pero sí un llenado con ceros en la dirección t_2 y los espectros presentados corresponden a los obtenidos con los datos adquiridos durante los gradientes positivos.

Para el cálculo de los datos de las curvas de las integrales de las señales de correlación de las diferentes especies detectadas con respecto al tiempo, se ha aplicado un programa desarrollado en nuestro grupo y escrito en lenguaje Matlab 7.11. Dicho programa lee todos los ficheros fid del experimento y calcula el espectro correspondiente a cada uno de ellos, para lo cual realiza la sustracción del *offset* de la señal, un llenado con ceros a lo largo de la dimensión directa y la transformada de Fourier respecto a t_2 . En este caso sólo se ha utilizado el espectro calculado con los datos adquiridos durante los gradientes positivos. Para cada espectro se calcula el promedio de la integral de la señal de correlación y de su señal simétrica. En este cálculo se han descartado los tres primeros experimentos a partir del momento de la inyección en los que la resolución no es suficiente para la determinación de las integrales correspondientes.

VI.5. Estudio mecanístico de la reacción de la acetofenona enriquecida en ^{13}C y anhídrido tríflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3 , empleando secuencias de UF-NMR de acoplamiento heteronuclear

VI.5.1. UF-HSQC: reacción de la acetofenona- β - ^{13}C y anhídrido tríflico (Tf_2O)

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro Bruker de 500 MHz y una sonda de RF BBO. Se estudia la reacción entre la acetofenona- β - ^{13}C (**56**) (298 mM) con Tf_2O (457mM) en presencia de acetonitrilo- d_3 que da lugar a la 2,4-dimetil-5- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 (**57**) como producto principal.

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 21.4 μL de acetofenona- β - ^{13}C en 0.6 mL de acetonitrilo- d_3 como disolvente. En el interior de la cánula de Teflón, se cargan 45.5 μL de Tf_2O , además del disolvente deuterado y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3.

Una vez ensamblado el dispositivo de inyección, se ajusta su posición dentro del tubo de RMN, según el medidor. Tubo y cánula se introducen dentro del equipo de RMN, la temperatura se gradúa a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del Tf_2O , la cual se lleva a cabo 20.42 segundos después, que es el equivalente en tiempo a dos experimentos UF-HSQC. En total se adquirieron 500 espectros UF-HSQC para cada ventana en 85.35 min, empleando la secuencia *ufhsqcDYN.ucm*.

Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=50$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e=26.75$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=2.5$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a=26.75$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=210$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1=67.2$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.0$ ppm. La potencia del pulso *chirp* empleada fue de 32 dB y el offset de -6000 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μs . El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=1.72$ ms, permite la detección de los acoplamientos de 145 Hz. Durante la adquisición se aplica un bloque de desacoplamiento GARP de duración 80 μs , con una potencia de 23 dB. Se adquieren 2 *scans* por experimento.

VI.5.2. UF-HMBC: reacción de la acetofenona- α - ^{13}C y anhídrido tríflico (Tf_2O)

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro Bruker de 500 MHz y una sonda de RF BBO. Se estudia la reacción entre la acetofenona-

α - ^{13}C (**58**) (300mM) con Tf_2O (450mM) en presencia de acetonitrilo- d_3 , que da lugar a la 2,4-dimetil-6- ^{13}C -6-fenilpirimidina- d_6 (**60**) como producto principal.

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 20.85 μL de acetofenona- α - ^{13}C en 0.6 mL de acetonitrilo- d_3 como disolvente. En el interior de la cánula de Teflón, se cargan 44.8 μL de Tf_2O , además del disolvente deuterado y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3.

Una vez ensamblado el dispositivo de inyección, se ajusta su posición dentro del tubo de RMN, según el medidor. Tubo y cánula se introducen dentro el equipo de RMN, la temperatura se gradúa a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del Tf_2O . A los 20 s, cuando se habían adquirido dos experimentos, uno para cada ventana, se realizó finalmente la inyección. En total se adquirieron 219 espectros UF-HMBC para cada ventana en 112 min, empleando la secuencia ***ufhsqc_dw_DYN.ucm***.

Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=50$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e=26.75$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=2.5$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a=40.13$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=102$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1=60$ ppm y en F_2 , $SW_2=7.0$ ppm. La potencia del pulso *chirp* empleada fue de 32 dB y el offset de -6000 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μs . El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=25.0$ ms, permite la detección de los acoplamientos de 10 Hz. Durante la adquisición se emplea un bloque de desacoplamiento WALTZ 16. Se adquieren 2 *scans* por cada ventana espectral dejando 10 segundos (*TR*) entre cada una de ellas.

VI.5.3. UF-HSQC Selectivo: reacción de la acetofenona y anhídrido tríflico (Tf₂O)

Basados en el seguimiento de la reacción de la acetofenona (**64**) y el anhídrido tríflico (Tf₂O) en presencia de acetonitrilo-*d*₃ mediante espectroscopía de RMN de ¹H (Figura 3.1, apartado 3.1), se han seleccionado tres ventanas espectrales para realizar los experimentos de UF-HSQC Selectivos. Estas comprenden 1.5 ppm aproximadamente en ¹H y de 10 a 20 ppm aproximadamente para la dimensión del ¹³C y son: (i) la región alifática, centrada a 2.2 ppm (¹H) y 28.7 ppm (¹³C), (ii) la región olefínica, centrada a 5.8 ppm (¹H) y 110.9 ppm (¹³C) y (iii) la región aromática, centrada a 8.2 ppm (¹H) y 117.4 ppm (¹³C).

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro Varian VNMRS de 600 MHz equipado con una sonda de triple canal HCN. Se estudia la reacción entre la acetofenona (**64**) (450 mM) con Tf₂O (675mM) en presencia de acetonitrilo-*d*₃, que da lugar a la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina-*d*₆ (**65**) como producto principal.

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 23.3 µL de acetofenona en 0.5 mL de acetonitrilo-*d*₃ como disolvente. En el interior de la cánula de Teflón, se cargan 56 µL de Tf₂O, además del disolvente deuterado y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3.

Una vez ensamblado el dispositivo de inyección, se ajusta su posición dentro del tubo de RMN, según el medidor. Tubo y cánula se introducen dentro del equipo de RMN, se gradúa la temperatura a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición del experimento dinámico se inició con antelación a la inyección del Tf₂O. Para cada ventana espectral se adquirieron 500 espectros UF-HSQC, con 12 *scans* cada 2 segundos, en un tiempo total de 410 minutos, empleando la secuencia de tiempo constante **CTgChsqcUF_Sel_DW.c**

Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=49.5$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e= 25.0$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}= 2.5$ ms;

intensidad del gradiente de adquisición, $G_a = 6.35$; ancho de banda del filtro a 25; tiempo de adquisición, $T_a = 600 \mu s$; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2 = 40$. Los pulsos *sinc* de 90° del bloque INEPT barren una frecuencia de 1 KHz y se aplican durante 1.42 ms.

Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1 = 10$ ppm y en F_2 , $SW_2 = 1.33$ ppm; se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p = 6.35$ G/cm, durante un tiempo de 160 μs . El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4 = 1.79$ ms, permite la detección de los acoplamientos de 140 Hz. Se adquieren 12 *scans* por experimento.

VI.5.4. UF-HSQC Selectivo: reacción de la acetofenona- β - ^{13}C y anhídrido tríflico (Tf_2O)

Con el fin de examinar la ventana olefínica, se repite el experimento UF-HSQC Selectivo con la reacción de la acetofenona- β - ^{13}C (**56**) (300mM) y Tf_2O (450mM) en presencia de acetonitrilo- d_3 .

El seguimiento de la reacción se realiza en un espectrómetro Varian VNMRS de 600 MHz equipado con una sonda de triple canal HCN. Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 17.8 μL de acetofenona en 0.5 mL de acetonitrilo- d_3 como disolvente. En el interior de la cánula de Teflón, se cargan 40 μL de Tf_2O , además del disolvente deuterado y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3.

Una vez ensamblado el dispositivo de inyección, se ajusta su posición dentro del tubo de RMN, según el medidor. Tubo y cánula se introducen dentro del equipo de RMN, se gradúa la temperatura a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF} = 49.5$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e = 25.0$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max} = 2.5$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a = 10.6$ G/cm; ancho de banda del

filtro a 42 KHz; tiempo de adquisición, $T_a=600\ \mu\text{s}$; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=40$. Los pulsos *sinc* de 90° del bloque INEPT barren una frecuencia de 1 KHz y se aplican durante 1.42 ms.

Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1=20\ \text{ppm}$ y en F_2 , $SW_2=1.33\ \text{ppm}$; se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p=10.6\ \text{G/cm}$, durante un tiempo de $160\ \mu\text{s}$. El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=1.79\ \text{ms}$, permite la detección de los acoplamientos de 140 Hz. Se adquieren 2 *scans* por experimento.

VI.6. Secuencia en tándem homo-heteronuclear UF-HMBC-TOCSY: Estudio mecanístico de la reacción de la ciclohexanona- α - ^{13}C y anhídrido triflico (Tf_2O) con acetonitrilo- d_3

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro Bruker de 500 MHz y una sonda de RF BBO. Se estudia la reacción entre la ciclohexanona- α - ^{13}C (**76**) (300mM) con Tf_2O (450mM), en presencia de acetonitrilo- d_3 para dar lugar a la formación de la pirimidina 2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahydroquinazolina- d_6 (**77**) como producto principal y al triflato de 1-ciclohexenilo (**78**) como subproducto (esquema 29).

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen $18.6\ \mu\text{L}$ de ciclohexanona- α - ^{13}C en 0.6 mL de acetonitrilo- d_3 como disolvente. En el interior de la cánula de Teflón, se cargan $44.8\ \mu\text{L}$ de Tf_2O , además del disolvente deuterado y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3.

Una vez montado el dispositivo de inyección, se ajusta su posición dentro de la muestra y la altura del tubo de resonancia, según el medidor. Tubo y cánula se introducen dentro del equipo de RMN, se gradúa la temperatura a 278 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición de los experimentos dinámicos se inició con antelación a la inyección del Tf_2O . En total se adquirieron 500 espectros UF-TOCSY-HMBC para cada rango espectral diferente, empleando la secuencia *uftocsyhsqcDYN.ucm*.

El **rango espectral A** comprende desde 0.75-3.75 ppm en ^1H y 151.5-218.5 ppm en ^{13}C . Se adquiere durante un total de 4.96 horas. Los parámetros de adquisición optimizados son:

Para la parte de la secuencia correspondiente al UF-HMBC: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=50$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e= 26.75$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}= 2.5$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a= 19.26$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=294$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1= 67.6$ ppm y en F_2 , $SW_2= 3.0$ ppm. La potencia del pulso chirp empleada fue de 32 dB y el offset de -6000 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p=16.05$ G/cm, durante un tiempo de 200 μs . El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=25.0$ ms, permite la detección de los acoplamientos de 10 Hz. Durante la adquisición se emplea un bloque de desacoplamiento GARP durante 80 μs , con una potencia de 23 dB. Se adquieren 4 scans por cada UF-HMBC y un tiempo TR de 10 segundos.

Para la parte de la secuencia correspondiente al UF-TOCSY: ancho de banda del pulso chirp $\Delta\Omega_{RF}= 60\text{KHz}$; intensidad del gradiente de codificación $G_e= 8.03$ G/cm; tiempo total de codificación $t_1^{max}= 10$ ms; intensidad del gradiente de adquisición $G_a= 13.91$ G/cm; tiempo de adquisición $T_a= 294$ μs ; número de pasos de la adquisición $N_2= 64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1= 3.2$ ppm y en F_2 , $SW_2= 3.0$ ppm. El gradiente de purga antes de la adquisición consistió en un gradiente con forma sinusoidal de intensidad $G_p=16.05$ G/cm durante un tiempo de 200 μs ; la secuencia *spin-lock* se aplicó durante 60 ms; la potencia del pulso chirp es de 28 dB y el offset de -1500 Hz. Se adquiere 1 scan por cada UF-TOCSY y un tiempo TR de 10 segundos.

El **rango espectral B** se extiende de 0.75 a 3.75 ppm en ^1H y de 151.5 a 218.5 ppm en ^{13}C . Se adquiere durante un total de 4.95 horas. Los parámetros de adquisición optimizados fueron:

Para la parte de la secuencia correspondiente al UF-HMBC: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=50$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e= 26.75$

G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max} = 2.5$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a = 19.26$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a = 160$ μ s; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2 = 64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μ s. Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1 = 60.0$ ppm y en F_2 , $SW_2 = 5.0$ ppm. La potencia del pulso *chirp* empleada fue de 32 dB y el offset es de -6000 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p = 16.05$ G/cm, durante un tiempo de 200 μ s. El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4 = 25.0$ ms, permite la detección de los acoplamientos de 10 Hz. Durante la adquisición se emplea un bloque de desacoplamiento GARP durante 80 μ s, con una potencia de 23 dB. Se adquieren 4 *scans* por cada UF-HMBC, con un tiempo *TR* de 10 segundos.

Para la parte de la secuencia correspondiente al UF-TOCSY: ancho de banda del pulso *chirp* $\Delta\Omega_{RF} = 60$ KHz; intensidad del gradiente de codificación $G_e = 8.03$ G/cm; tiempo total de codificación $t_1^{max} = 10$ ms; intensidad del gradiente de adquisición $G_a = 13.91$ G/cm; tiempo de adquisición $T_a = 160$ μ s; número de pasos de la adquisición $N_2 = 64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μ s. Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1 = 5.0$ ppm y en F_2 , $SW_2 = 5.2$ ppm. El gradiente de purga antes de la adquisición consistió en un gradiente con forma sinusoidal de intensidad $G_p = 16.05$ G/cm durante un tiempo de 200 μ s; la secuencia *spin-lock* se aplicó durante 60 ms; la potencia del pulso *chirp* es de 28 dB y el offset de -1500 Hz. Se adquiere 1 *scan* por cada UF-TOCSY con un tiempo *TR* de 10 segundos.

VI.7. Seguimiento en tiempo real de una reacción de cicloadición Diels-Alder [4+2]

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro Bruker de 500 MHz y una sonda de RF BBO. Se estudia la cicloadición Diels-Alder entre el 1,2,3,4,5-pentametilciclopentadieno (**82**) (200 mM) y fumarato de dietilo (**87**) (230 mM) en $CDCl_3$ (Esquema 34c).

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 18.79 μ L de PMCP en 0.6 mL de $CDCl_3$. En la cánula de Teflón se introducen 25.6 μ L de fumarato de dietilo,

disueltos en 0.03 mL de CDCl_3 , además del disolvente deuterado y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3. Se introduce la cánula en el tubo de RMN y se ajusta su posición dentro del mismo según el medidor. Tubo y cánula se introducen dentro del equipo, se gradúa la temperatura a 298 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición de los experimentos dinámicos se inició con antelación a la inyección del fumarato de dietilo. En total se adquirieron 993 espectros UF-TOCSY en un tiempo total de 104.83 min, empleando la secuencia modulada en amplitud *uftocsyDYN.ucm*.

Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=60$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e= 8.03$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}= 10.0$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a= 38.52$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=168$ μ s; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μ s. Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales: en F_1 , $SW_1= 4.84$ ppm y en F_2 , $SW_2= 4.80$ ppm. La potencia del pulso chirp empleada fue de 28 dB y el offset de -1800 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μ s; la secuencia DIPSI se aplicó durante 60 ms. Se adquieren 2 scans por cada UF-TOCSY con un tiempo TR de 3 segundos.

VI.8. UF-HMBC ^1H , ^{31}P : Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov

El seguimiento de la reacción se ha llevado a cabo en un espectrómetro Bruker de 500 MHz y una sonda de RF BBO. Se estudia la reacción de Michaelis-Arbuzov entre el fosfito de trietilo (**95**) (300 mM) y el bromuro de bencilo (**96**) (300 mM) en presencia y ausencia del catalizador bromuro de zinc (ZnBr_2) (0.2 mM) (esquema 38).

VI.8.1. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en ausencia de ácido de Lewis

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 31.22 μL de fosfito de trietilo (**95**) disuelto en 0.6 mL de tetracloroetano- d_2 (TCE- d_2). En la cánula de teflón se introducen 21.41 μL de bromuro de bencilo (**96**), disueltos en 0.05 mL de TCE- d_2 , además del disolvente y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3. Se introduce la cánula en el tubo de RMN y se ajusta su posición dentro del mismo según el medidor. Tubo y cánula se introducen dentro del equipo de RMN, se gradúa la temperatura a 343 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

La adquisición de los experimentos dinámicos se inició con antelación a la inyección del Tf_2O . En total se adquirieron 112 espectros UF-HMBC ^1H , ^{31}P para cada rango espectral en 64.90 min, empleando la secuencia modulada en amplitud *ufhsqc_nd_dw_pr_DYN.ucm*.

Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=40$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e=10.70$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=2.5$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a=40.13$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=210$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1=62.2$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.0$ ppm. La potencia del pulso chirp empleada fue de 31 dB y el offset de -10000 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μs . El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=31.25$ ms, permite la detección de los acoplamiento de 8 Hz. Se adquieren 2 *scans* por cada ventana espectral dejando 10 segundos (*TR*) entre cada una de ellas.

VI.8.2. Estudio de la reacción de Michaelis-Arbuzov en presencia de ácido de Lewis.

Dentro de un tubo de RMN de 5 mm se disponen 31.22 μL de fosfito de trietilo (**95**), 35.8 mg de ZnBr_2 y 0.6 mL de tetracloroetano- d_2 (TCE- d_2). En la cánula de teflón se introducen 21.41 μL de bromuro de bencilo (**96**), disueltos en 0.05 mL de TCE- d_2 , además del disolvente deuterado y las correspondientes burbujas de aire, según se explica en el apartado VI.3. Se introduce la cánula al tubo de RMN y se ajusta su posición dentro del mismo con ayuda del medidor. Tubo y cánula se introducen dentro del equipo de RMN, se gradúa la temperatura a 343 K y se llevan a cabo los ajustes estándar (adecuación de los valores del nivel del lock, la sintonía de la sonda y la homogeneidad del campo).

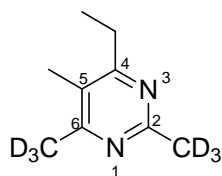
La adquisición de los experimentos dinámicos se inició con antelación a la inyección del Tf_2O . En total se adquirieron 800 espectros UF-HMBC ^1H , ^{31}P para cada rango espectral en 273.47 min, empleando la secuencia modulada en amplitud *ufhsqc_nd_dw_pr_DYN.ucm*.

Los parámetros de adquisición optimizados para este experimento fueron: ancho de banda del pulso chirp, $\Delta\Omega_{RF}=40$ KHz; intensidad del gradiente de codificación, $G_e=10.70$ G/cm; tiempo total de codificación, $t_1^{max}=2.5$ ms; intensidad del gradiente de adquisición, $G_a=26.75$ G/cm; tiempo de adquisición, $T_a=210$ μs ; número de pasos de la secuencia EPSI, $N_2=64$; el tiempo de desconexión de los gradientes fue de 40 μs . Estos parámetros proporcionan las siguientes anchuras espectrales para cada ventana de adquisición: en F_1 , $SW_1=41.5$ ppm y en F_2 , $SW_2=4.0$ ppm. La potencia del pulso chirp empleada fue de 30 dB y el offset de -8000 Hz; previo a la adquisición se aplicó un gradiente de purga con forma sinusoidal de intensidad, $G_p=16.01$ G/cm, durante un tiempo de 200 μs . El tiempo de aplicación del bloque INEPT, $d_4=31.25$ ms, permite la detección de los acoplamientos de 8 Hz. Se adquieren 2 scans dejando 5 segundos (TR) entre cada experimento

VI.9. Síntesis de alquil y aril pirimidinas: Método general

A una solución de anhídrido trifluorometanosulfónico (Tf_2O) y acetonitrilo- d_3 en 10 mL de diclorometano anhidro, se le adiciona lentamente y con agitación una disolución de cetona en 10 mL de diclorometano. Las proporciones molares empleadas de cetona/nitrilo/anhídrido son 1.0/2.2/1.5 respectivamente. Terminada la adición la mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente, pudiéndose seguir el avance del proceso mediante cromatografía en placa fina.

El crudo de reacción se hidroliza añadiendo disolución saturada de NaHCO_3 hasta pH básico, se separa la fase orgánica y se lava con una disolución saturada de NaCl hasta pH neutro. La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se elimina el diclorometano a presión reducida. El bruto de reacción es purificado por cromatografía de columna sobre gel de sílice empleando una mezcla de hexano/acetato de etilo 8:2 como eluyente.

VI.9.1 Síntesis de la 4-etil-2,5,6-trimetilpirimidina- d_6 (55)

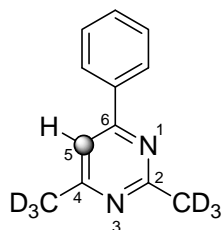
Siguiendo el método general (apartado VI.10) se hacen reaccionar 0.5 g (5.81 mmol) de 3-pentanona con 0.56 g (12.78 mmol) de acetonitrilo- d_3 y 2.46 g (8.72 mmol) de Tf_2O en 20 mL de diclorometano. Tiempo de reacción 20 h. El producto **55** se obtiene con un rendimiento del 90%.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3CN): δ 1.09 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz), 2.08 (s, 3H), 2.65 (c, 2H, $J = 7.6$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CD_3CN): δ 12.0 ($\underline{\text{CH}_3}$ - CH_2), 12.72 (CH_3), 28.02 (CH_3 - $\underline{\text{CH}_2}$), 21.0 (CD_3 -C6), 23.5 (CD_3 -C2), 124.6 (C5), 163.5 (C6), 165.3 (C2), 169.3 (C4) ppm.

EM (HRMS-ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 157.16055, calculado para $\text{C}_9\text{H}_9\text{D}_6\text{N}_2$ 157.16118.

VI.9.2 Síntesis de la 2,4-dimetil-5-¹³C-6-fenilpirimidina-*d*₆ (57)



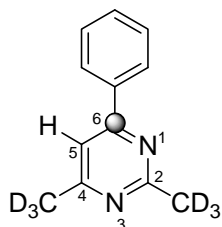
Se obtuvo una muestra analítica de la pirimidina **57** a través de su aislamiento y purificación a partir de diferentes ensayos realizados con acetofenona- β -¹³C. El crudo de reacción es tratado según el procedimiento descrito en el apartado VI.10. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía en placa preparativa en hexano:acetato de etilo 8:2. Se obtiene así una pequeña cantidad de muestra con la pureza suficiente para caracterizar la molécula de manera inequívoca.

¹H-RMN (500 MHz, CD₃CN): δ 7.51 (m, 3H), 7.55 (d, 1H, $^1J_{13\text{C-H}} = 165$ Hz), 8.11 (m, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃CN): δ 114.2 (C5), 127.9, 129.8, 131.6 (C_{arom}), 138.1 (d, $^2J_{13\text{C-C}} = 5.1$ Hz, C_{ipso}), 164.2 (d, $^1J_{13\text{C-C}} = 58.4$ Hz, C6), 168.5 (C4), 169.0 (C2) ppm.

EM (HRMS-ESI) [M+H]⁺ 192.14909, calculado para ¹³C₁¹²C₁₁H₇D₆N₂ 192.14834.

VI.9.3 Síntesis de la 2,4-dimetil-6-¹³C-6-fenilpirimidina-*d*₆ (60)



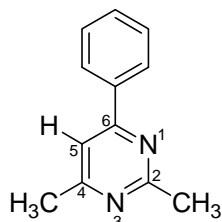
Se obtuvo una muestra analítica de la pirimidina **60** a través de su aislamiento y purificación a partir de muestras utilizadas para el seguimiento por UF-NMR de la correspondiente reacción realizada con acetofenona- α -¹³C. El crudo de reacción es tratado según el procedimiento descrito en el apartado VI.10. El producto obtenido se purifica mediante cromatografía en placa preparativa en hexano:acetato de etilo 8:2. Se obtiene así una pequeña cantidad de muestra con la pureza suficiente para caracterizar la molécula de manera inequívoca.

¹H-RMN (500 MHz, CD₃CN): δ 7.51 (m, 3H), 7.55 (d, 1H, $^2J_{13\text{C-H}} = 1.9$ Hz, H5), 8.11 (m, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃CN): δ 114.2 (d, $^1J_{13\text{C-C}} = 57.6$ Hz, C5), 127.9, 129.8, 131.6 (C_{arom}), 138.1 (d, $^1J_{13\text{C-C}} = 62.1$ Hz, C_{ipso}), 164.2 (C6), 168.5 (C4), 168.8 (C2) ppm.

EM (HRMS-ESI) [M+H]⁺ 192.14816, calculado para ¹³C₁¹²C₁₁H₇D₆N₂ 192.14888.

VI.9.4 Síntesis de la 2,4-dimetil-6-fenilpirimidina (**66**)²²⁴



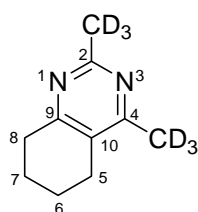
Siguiendo el método general (apartado VI.10) se hacen reaccionar 0.5 g (4.16 mmol) de acetofenona con 0.38 g (9.16 mmol) de acetonitrilo y 1.41 g (4.99 mmol) de Tf_2O en 20 mL de diclorometano. Tiempo de reacción 36 h. El producto **66** se obtiene con un rendimiento del 85%.

¹H-RMN (500 MHz, CD_3CN): δ 2.46 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}_4$), 2.63 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}_2$), 7.50 (m, 4H), 8.09 (m, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD_3CN): δ 24.3 ($\text{CH}_3\text{-C}_4$), 26.3 ($\text{CH}_3\text{-C}_2$), 114.2 (C_5), 127.9 (C_o), 129.8 (C_m), 131.5 (C_p), 138.1 (C_{ipso}), 164.2 (C_6), 168.5 (C_2), 168.8 (C_4) ppm.

EM (HRMS-ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 185.10763, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2$ 185.10732

VI.9.5 Síntesis de la 2,4-dimetil-5,6,7,8 tetrahydroquinazolina-*d*₆ (**77**)



Siguiendo el método general (apartado VI.10) se hacen reaccionar 0.5 g (5.09 mmol) de ciclohexanona con 0.49 g (9.16 mmol) de acetonitrilo-*d*₃ y 1.72 g (6.11 mmol) de Tf_2O en 20 mL de cloroformo. Tiempo de reacción 48 h. El producto **77** se obtiene con un rendimiento del 12.5%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 1.81 (m, 4H), 2.60 (m, 2H), 2.71 (m, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD_3CN): δ 20.7 ($\text{CD}_3\text{-C}_4$), 21.7, 21.9 (C_6 , C_7), 24.0 (C_5), 29.0 ($\text{CD}_3\text{-C}_2$), 31.7 (C_8), 124.4 (C_{10}), 163.0 (C_4), 164.0 (C_9), 164.5 (C_2) ppm.

EM (HRMS-ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 169.16043, calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{D}_6\text{N}_2$ 169.16064.

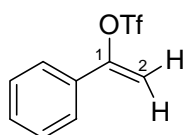
²²⁴ García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Moreno Jiménez, F.; García Fraile, A.; Subramanian, L.R.; Hanack, M. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 1627-1630.

VI.10. Síntesis de triflatos de vinilo: Método general

Sobre una suspensión del compuesto carbonílico y carbonato sódico (Na_2CO_3) en 20 mL de cloruro de metileno anhidro, se adicionan lentamente, con agitación magnética y a 0°C (baño de hielo), una solución de anhídrido trifluorometanosulfónico (Tf_2O) en 10 mL de cloruro de metileno anhidro. Las proporciones molares empleadas de cetona/ Na_2CO_3 / Tf_2O son 1/2.0/1.7 respectivamente.

Finalizada la adición, la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas, al cabo de las cuales se separa la fase sólida mediante filtración. La disolución así obtenida se lava sucesivamente con una disolución saturada de NaHCO_3 hasta pH básico, se separa la fase orgánica y se lava con una disolución saturada de NaCl hasta pH neutro. La fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. El bruto de reacción es purificado por cromatografía de columna sobre gel de sílice empleando pentano como eluyente.

VI.10.1 Síntesis del triflato de 1-fenilvinilo (**67**)²²⁵



Siguiendo el método general (apartado VI.11), se hace reaccionar una disolución de 1.0 g (8.32 mmol) de acetofenona con 1.8 g (16.7 mmol) de Na_2CO_3 en 20 mL de diclorometano anhidro con una disolución de 4.0 g (14.2 mmol) de Tf_2O en 10 mL de diclorometano anhidro. Tiempo de reacción 24 h. El producto **67** es altamente reactivo, hidrolizándose con gran facilidad. La purificación se lleva a cabo mediante un percolado en pipeta pasteur, empleado CDCl_3 , para su posterior e inmediata caracterización.

¹H-RMN (500 MHz, CD_3CN): δ 5.46 (AB, 1H, $J_{\text{H,H}} = 4.4$ Hz), 5.81 (AB, 1H, $J_{\text{H,H}} = 4.4$ Hz), 7.48 (m, 3H), 7.61 (m, 2H) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CD_3CN): δ 106.5 (C2), 126.3, 130.0, 131.4 (C_{arom}), 132.9 (C_{ipso}), 154.5 (C1) ppm.

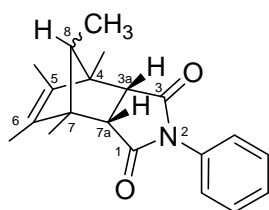
²²⁵ Hargrove, R. J.; Dueber, T. E.; Stang, P. J. *J. Chem. Soc. D*, **1970**, 23, 1614-1615.

VI.11. Síntesis de los aductos de cicloadición Diels-Alder: Método general

A una disolución de 1,2,3,4,5-pentametilciclopentadieno (PMCP) en 5 mL en diclorometano anhidro se le adiciona lentamente y con agitación, el filodieno disuelto en 5 mL de diclorometano. Las proporciones son equimolares. Terminada la adición la mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente, pudiéndose seguir el avance del proceso mediante cromatografía en placa fina.

Se elimina el exceso de diclorometano a presión reducida. El bruto de reacción se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice, empleando una mezcla de hexano/acetato de etilo 8:2 como eluyente. Los aductos *sin* y *anti* no se pueden separar cromatográficamente.

VI.11.1 Síntesis de *sin/anti* 2-fenil-4,5,6,7,8-pentametil-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoisoindol-1,3-diona (**84**)²²⁶



Siguiendo el método general (apartado VI.12) se hacen reaccionar 51.8 mg (0.38 mmol) de PMCP con 60.6 mg (0.38 mmol) de *N*-fenilmaleimida en 10 mL de diclorometano anhidro. Tiempo de reacción 12 h. El producto **84** se obtiene con un rendimiento del 68%, en una proporción del 81.5% del isómero *anti* y 18.5% del

isómero *sin*.

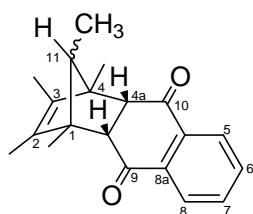
¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 0.64 (d, 3H, ³J_{H-H} = 6.4 Hz, CH₃-C8, *anti*), 0.78 (d, 3H, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, CH₃-C8, *sin*), 1.37 (s, 6H, CH₃-C5, *sin*), 1.38 (s, 6H, CH₃-C5, *anti*), 1.47 (m, 1H, C8, *sin*), 1.59 (s, 6H, CH₃-C4, *anti*), 1.62 (m, 1H, C8, *anti*), 1.64 (s, 6H, CH₃-C4, *sin*), 3.04 (s, 4H, C3a), 7.06, 7.34, 7.42 (10H, sistema aromático monosustituido) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 7.6 (CH₃-C8, *anti*), 9.7 (CH₃-C8, *sin*), 11.2 (CH₃, CH₃-C4, *sin*), 11.4 (CH₃, CH₃-C4, *anti*), 14.2 (CH₃, CH₃-C5, *sin*), 14.9 (CH₃, CH₃-C5, *anti*), 51.3 (C3a, *sin*), 53.3 (C3a, *anti*), 57.4 (C4, *sin*), 58.3 (C4, *anti*), 65.6 (C8, *anti*), 66.1 (C8, *sin*), 126.7, 128.4, 129.2 (C_{aromáticos}), 132.3 (C_{ipso}), 133.8 (C5, *anti*), 138.6 (C5, *sin*), 176.7 (C=O, *anti*), 177.1 (C=O, *sin*) ppm.

²²⁶ Burnell, J.; Valenta, Z. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 18, 1247-1248.

EM (HRMS-ESI) $[M+H]^+$ 310.18070, calculado para $C_{20}H_{24}O_2N$ 310.18069.

VI.11.2 Síntesis de *sin/anti* 1,2,3,4,11-pentametil-1,4,4a,9a-tetrahidro-1,4-metanoantraceno-9,10-diona (**86**)²³⁶



Siguiendo el método general (apartado VI.12) se hacen reaccionar 103 mg (0.76 mmol) de PMCP con 100 mg (0.63 mmol) de 1,4-naftoquinona en 10 mL de diclorometano anhidro. Tiempo de reacción 12 h. El aducto se obtiene con un rendimiento del 94%, en una proporción del 72% del isómero *anti* y 28% del isómero *sin* (1H -RMN). Pf= 127-130

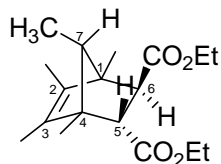
C° (Hexano).

1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.60 (d, 3H, $^3J_{H-H} = 6.4$ Hz, CH_3 -C11, *sin*), 0.76 (d, 3H, $^3J_{H-H} = 6.7$ Hz, CH_3 -C11, *anti*), 1.05 (s, 6H, CH_3 -C4, *sin*), 1.12 (s, 6H, CH_3 -C4, *anti*), 1.21 (c, 1H, $^3J_{H-H} = 6.7$ Hz, C11, *anti*), 1.29 (s, 6H, CH_3 -C3, *anti*), 1.30 (s, 6H, CH_3 -C3, *sin*), 1.52 (c, 1H, $^3J_{H-H} = 6.4$ Hz, C11, *sin*), 3.09 (s, 4H, C4a, *anti*), 3.11 (s, 4H, C4a, *sin*), 7.63 (m, 2H, C6), 7.91 (m, 2H, C5) ppm.

^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$): δ 7.5 (CH_3 -C11, *sin*), 9.8 (CH_3 -C11, *anti*), 11.3 (CH_3 -C4, *anti*), 11.4 (CH_3 -C4, *sin*), 13.7 (CH_3 -C3, *anti*), 14.4 (CH_3 -C3, *sin*), 55.3 (C4a, *anti*), 58.3 (C4a, *sin*), 61.3 (C4, *anti*), 62.3 (C4, *sin*), 62.9 (C11, *anti*), 63.2 (C11, *sin*), 126.0 (C5), 133.6 (C6), 134.1 (C8a), 136.7 (C3, *sin*), 139.0 (C3, *anti*), 197.8 (C9, *sin*), 198.5 (C9, *anti*) ppm.

EM (HRMS-ESI) $[M+Na]^+$ 317.15044, calculado para $C_{20}H_{22}O_2Na$ 317.15176.

VI.11.3 Síntesis de *anti* 1,4,5,6,7-pentametilbiciclo [2.2.1] hept-5-ene-2,3-dicarboxilato de etilo (**88**)



Siguiendo el método general (apartado VI.12) se hacen reaccionar 79.1 mg (0.58 mmol) de PMCP con 100 mg (0.58 mmol) de fumarato de dietilo en 10 mL de diclorometano anhidro y se calienta a 50°C. Tiempo de reacción 24 h. El producto **88** se obtiene con un rendimiento del 85% y se confirma mediante experimentos de NOESY 1D que se trata del isómero *anti*.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 0.56 (d, 3H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, CH₃-C7), 1.01 (s, 3H, CH₃-C1), 1.25 (m, 9H, CH₂CH₃ y CH₃-C4), 1.43 (s, 3H, CH₃-C5), 1.55 (CH₃-C6), 1.96 (c, 1H, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, C7), 2.61 (AB, 1H, J_{H-H} = 4.8 Hz, C2), 3.00 (AB, 1H, J_{H-H} = 4.8 Hz, C3), 4.10 (m, 4H, CH₂CH₃) ppm.

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 7.9 (CH₃-C7), 9.6 (CH₃-C6), 11.4 (CH₃-C5), 12.9 (CH₃-C1), 14.4 (CH₃-C4), 14.4, 14.5 (CH₂CH₃), 52.7 (C2), 56.3 (C3), 57.3 (C7), 58.0 (C1), 58.1 (C4), 60.3, 60.5 (CH₂CH₃), 134.2 (C3), 135.7 (C6), 173.4, 174.8 (C=O) ppm.

EM (HRMS-ESI) [M+Na]⁺ 331.18825, calculado para C₁₈H₂₈O₄Na 331.18798.

Anexo A

Programas de pulsos

En este Apéndice se incluyen los listados de los programas de pulsos empleados a lo largo de este trabajo. La mayoría de ellos se han sido desarrollados en nuestro grupo de investigación, escritos para TOPSPIN 1.3 y han sido empleados en el espectrómetro AV500 del CAI de RMN y RSE de la UCM. Para otras versiones de TOPSPIN y otros espectrómetros los cambios necesarios serían mínimos.

La secuencia calibgp, empleada para la calibración del módulo de gradientes es una secuencia Bruker, que viene instalada por defecto en el equipo.

Programa de pulsos para la calibración de gradientes: *Calibgp*

```
;calibgp
;avance-version (04/09/06)
;calibration of gradient strength
```

```
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <De.incl>
```

```
define delay GR_LEN
```

```
"p2=p1*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
```

```
"GR_LEN=aq*0.5"
```

```
1 ze
2 30m
20u BLKGRAD
d1
50u UNBLKGRAD
```



```
p1 ph1
GR_LEN gron1
d16 groff
p2 ph2
50u
d16
d21 gron1
ACQ_START(ph30,ph31)
aq DWELL_GEN:f1
d12 groff
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit

ph1=0
ph2=1 3
ph30=0
ph31=0

;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse : ca. aq/2
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: gradient stabilisation delay [100 usec]
;NS: 2 * n, total number of scans: NS * TD0

;use gradient : gp 1

;this program can be used for dmx as well

;$Id: calibgp,v 1.12 2005/11/10 12:16:59 ber Exp $
```

Programa de pulsos del experimento UF-TOCSY modulado en amplitud:
uftocsy.ucm

```

;uftocsy.ucm
;UF H-H correlation, Hartman-Hahn transfer using DIPSY sequence for mixing
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"l1=FACTOR1*2"
1      ze
2      d11
d1 BLKGRAD
50u UNBLKGRAD
d12 pl1:f1
5u gron1
p11:sp1 ph1
5u groff
d16
5u gron2
p11:sp1 ph4
5u groff
d16
d12 pl10:f1
;begin DIPSI2
4      p6*3.556 ph23
p6*4.556 ph25
p6*3.222 ph23
p6*3.167 ph25
p6*0.333 ph23
p6*2.722 ph25
p6*4.167 ph23
p6*2.944 ph25
p6*4.111 ph23
p6*3.556 ph25
p6*4.556 ph23
p6*3.222 ph25
p6*3.167 ph23
p6*0.333 ph25
p6*2.722 ph23
p6*4.167 ph25
p6*2.944 ph23
p6*4.111 ph25
p6*3.556 ph25

```

```

        p6*4.556 ph23
        p6*3.222 ph25
        p6*3.167 ph23
        p6*0.333 ph25
        p6*2.722 ph23
        p6*4.167 ph25
        p6*2.944 ph23
        p6*4.111 ph25
        p6*3.556 ph23
        p6*4.556 ph25
        p6*3.222 ph23
        p6*3.167 ph25
        p6*0.333 ph23
        p6*2.722 ph25
        p6*4.167 ph23
        p6*2.944 ph25
        p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
;end DIPSI2
        d12 pl1:f1
        p1:f1 ph3
        p16:gp6
        d16
        (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
        RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
        4u DWELL_GEN:f1
5        p13:gp3
        d16
        p13:gp4
        d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
4u BLKGRAD
exit
ph23=3
ph25=1
ph3=0
ph1 = 0 2
ph4 = 2 2
ph30 = 0
ph31 = 0 2

```

Programa de pulsos del experimento UF-COSY de tiempo constante:
ufcosyCT.ucm

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
1      ze
2      d11
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 p11:f1
      p1 ph1
      5u gron1
      p11:sp1 ph4 ;180
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph5 ;180
      5u groff
      d16
      d9
      p2 ph2
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
      RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
5      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0 2
ph2=0 0
ph4=0
ph5=0 ;2 2
ph6=0 2
ph30=0
ph31=0 2
ph21=0
```

Programa de pulsos del experimento UF-TOCSY de tiempo constante:
uftocsyCT.ucm

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"!1=FACTOR1*2"
1      ze
2      d11
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD

      d12 pl1:f1
      p1 ph1
      5u gron1
      p11:sp1 ph4 ;180
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph5 ;180
      5u groff
      d16
;begin DIPSI2
4      p6*3.556 ph23
      p6*4.556 ph25
      p6*3.222 ph23
      p6*3.167 ph25
      p6*0.333 ph23
      p6*2.722 ph25
      p6*4.167 ph23
      p6*2.944 ph25
      p6*4.111 ph23
      p6*3.556 ph25
      p6*4.556 ph23
      p6*3.222 ph25
      p6*3.167 ph23
      p6*0.333 ph25
      p6*2.722 ph23
      p6*4.167 ph25
      p6*2.944 ph23
      p6*4.111 ph25
      p6*3.556 ph25
      p6*4.556 ph23
```

```

        p6*3.222 ph25
        p6*3.167 ph23
        p6*0.333 ph25
        p6*2.722 ph23
        p6*4.167 ph25
        p6*2.944 ph23
        p6*4.111 ph25
        p6*3.556 ph23
        p6*4.556 ph25
        p6*3.222 ph23
        p6*3.167 ph25
        p6*0.333 ph23
        p6*2.722 ph25
        p6*4.167 ph23
        p6*2.944 ph25
        p6*4.111 ph23
lo to 4 times l1
;end DIPSI2
        p16:gp6
        d16
        (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
        RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
        4u DWELL_GEN:f1

5        p13:gp3
        d16
        p13:gp4
        d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0 2
ph2=0 0
ph4=0
ph5=0
ph6=0 2
ph30=0
ph31=0 2
ph21=0
ph23=3
ph25=1

```

**Programa de pulsos del experimento UF-HSQC modulado en amplitud:
*ufhsqc.ucm***

```
;ufhsqc.ucm
;UF H-C shift correlation
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"d7=0.5*(d16-p2*2)"
"d17=d4-p16-d16"
1      ze
2      d1
      d11 BLKGRAD
      d11 UNBLKGRAD
      12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph1):f1
      d4
      (center (p2*2 ph7):f2 (p1*2 ph2):f1)
      d4
      (p1 ph3):f1
      5u gron1
      (p12:sp2 ph8):f2
      5u groff
      d16
      (p1*2 ph4):f1
      d16
      5u gron2
      (p12:sp2 ph9):f2
      5u groff
      d16
      d12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph5):f1
      d4
      (center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
      d17      ;=d4-p16-d16
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
      RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
      10u pl12:f2
      5u cpd2:f2
7      p13:gp3
      d16
```

p13:gp4
d16
lo to 7 times l4
5u do:f2
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph0=0
ph7=0
ph8=0 2
ph9=2 2
ph10=0
ph30=0
ph31=0 2

Programa de pulsos del experimento UF-HSQC modulado en amplitud sin desacoplador, para correlaciones ^1H , ^{31}P : *ufhsqc_ND.ucm*

```
;ufhsqc_ND.ucm
;avance-version (05/10/24)
;single scan H-C shift correlation

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>

;#define PRESAT

;"d0=in0*0.5 - p2*0.637 - p1" ; for F1 phase ph0 90 ph1 -180
"d12=20u"
"d13=3u"
;"d7=0.5*(d16-p2*2)"
"d17=d4-p16-d16"

1 ze
2 d1
  d11 BLKGRAD
  d11 UNBLKGRAD

;presaturacion
#ifdef PRESAT
3      5u fq1:f1
      d12 pl9:f1
      d29 cw:f1 ph29
      d13 do:f1
lo to 3 times 1
#endif

  d12 fq=0:f1
  d12 pl1:f1 pl2:f2
  (p1 ph1):f1
  d4
  (center (p2*2 ph7):f2 (p1*2 ph2):f1)
  d4
  (p1 ph3):f1

;excitacion selectiva
  5u gron1
  (15u p12:sp2 ph8):f2
```

```

5u groff
d16
(p1*2 ph4):f1
d16
5u gron2
(15u p12:sp2 ph9):f2
5u groff
d16

d12 pl1:f1 pl2:f2
(p1 ph5):f1
d4
(center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
d17          ;:=d4-p16
p16:gp6
d16

(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
;10u pl12:f2
;5u cpd2:f2

;EPI
7 p13:gp3
d16
p13:gp4
d16
lo to 7 times l4

rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph7=0
ph8=0 2
ph9=2 2

```

```

ph10=0
ph29=0
ph30=0
ph31=0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p12 : f2 channel - 90 degree shaped pulse
;sp2 : f2 channel - power level for shaped pulse
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;d0 : incremented delay (2D)      [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O          [30 msec]
;d12: delay for power switching   [20 usec]
;d13: short delay                 [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;l4 : loop counter for acquisition loop (N2)
;td : =((l4*(2*(p13+d16)))/dw)[+6]
;fq1list : O1 for presat
;fq2list : O1 for f2 irradiation frequency
;fq3list : O1 for f1 irradiation frequency
;fq4list : O1 for f2 shaped pulse
;use gradient:
;gp1 : positive excitation z gradient (length = p12)
;gp2 : negative excitation z gradient (length = p12)
;gp3 : positive acquisition z gradient
;gp4 : negative acquisition z gradient
;p13 : acquisition gradient length
;gp5 : long purge gradient
;p15 : long purge gradient length [2000 usec]
;gp6 : short purge gradient
;p16 : short purge gradient length [200 usec]
;use gradient files:
;gpnam3 : RECT.1
;gpnam4 : RECT.1
;gpnam5 : SINE.100 / SINE.20
;gpnam6 : RECT.1

```

Programa de pulsos del experimento dinámico UF-TOCSY modulado en amplitud: *uftocsyDYN.ucm*

```

;uftocsyDYN.ucm
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"I1=FACTOR1*2"
1      ze
6      d0
2      d11
      50u BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d1
      d12 pl1:f1
      5u gron1
      p11:sp1 ph1
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph4
      5u groff
      d16
      d12 pl10:f1
;begin DIPSI2
4      p6*3.556 ph23
      p6*4.556 ph25
      p6*3.222 ph23
      p6*3.167 ph25
      p6*0.333 ph23
      p6*2.722 ph25
      p6*4.167 ph23
      p6*2.944 ph25
      p6*4.111 ph23
      p6*3.556 ph25
      p6*4.556 ph23
      p6*3.222 ph25
      p6*3.167 ph23
      p6*0.333 ph25
      p6*2.722 ph23
      p6*4.167 ph25
      p6*2.944 ph23
      p6*4.111 ph25

```

```

        p6*3.556 ph25
        p6*4.556 ph23
        p6*3.222 ph25
        p6*3.167 ph23
        p6*0.333 ph25
        p6*2.722 ph23
        p6*4.167 ph25
        p6*2.944 ph23
        p6*4.111 ph25
        p6*3.556 ph23
        p6*4.556 ph25
        p6*3.222 ph23
        p6*3.167 ph25
        p6*0.333 ph23
        p6*2.722 ph25
        p6*4.167 ph23
        p6*2.944 ph25
        p6*4.111 ph23
;end DIPSI2
        d12 pl1:f1
        p1:f1 ph3
        p16:gp6
        d16
        (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
        4u DWELL_GEN:f1
5        p13:gp3
        d16
        p13:gp4
        d16
lo to 5 times l4
rcyc=2
30m mc #0 to 6 F1QF(zd)
4u BLKGRAD
exit
ph1 = 0 2
ph3=0
ph4 = 2 2
ph23=3
ph25=1
ph29=0
ph30 = 0
ph31 = 0 2

```

Programa de pulsos del experimento dinámico UF-HSQC modulado en amplitud: *ufhsqcDYN.ucm*

```

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"d7=(d16-p2*2)"
"d17=d4-p16"
1      ze
6      d0
2      d11
      50u BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD 3 d1
3      d1
      d12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph1)
      d4
      (center(p2*2 ph7):f2 (p1*2 ph2):f1)
      d4
      (p1 ph3)
      5u gron1
      (p12:sp2 ph8):f2
      5u groff
      d16
      (p1*2 ph4):f1
      d16
      5u gron2
      (p12:sp2 ph9):f2
      5u groff
      d16
      d12 pl1:f1 pl2:f2
      (p1 ph5):f1
      d4
      (center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
      d17              :=d4-p16-d16
      p16:gp6
      d16
      (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
      4u DWELL_GEN:f1
      10u pl12:f2 cpd2:f2
7      p13:gp3
      d16
      p13:gp4

```

VII. Anexo A

d16
lo to 7 times l4
5u do:f2
rcyc=2
30m mc #0 to 6 F1QF(zd)
d11 BLKGRAD
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=1
ph6=0
ph7=0 0 0 0 2 2 2 2
ph9=2 2
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph30=0 ph8=2 0
ph31=2 0

Programa de pulsos del experimento dinámico UF-HSQC modulado en amplitud, doble ventana: *ufhsqcDYN_DW.ucm*

```
;ufhsqcDYN_DW.ucm
;avance-version (05/10/24)
;single scan H-C shift correlation

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>

#define PRESATV2

;"d0=in0*0.5 - p2*0.637 - p1" ; for F1 phase ph0 90 ph1 -180
;"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"
"d7=(d16-p2*2)"
"d17=d4-p16"
"d36=p2-p1"

define loopcounter td1medio
"td1medio = td1 * 0.5"

define delay MCWRK
define delay MCREST
"MCWRK = 0.500000*30m"
"MCREST = d11 - 30m"

;VENTANA 1
1      ze
      d2
2      MCWRK * 2
      LBLF1A, MCREST
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD

;offset pulsos duros de f2 para la ventana 1
5u fq1:f2
d12 pl1:f1 pl2:f2
;INEPT
(p1 ph1)
d4
(center(p2*2 ph7):f2 (p1*2 ph2):f1)
```



```

d4
(p1 ph3)

;excitacion selectiva
5u gron1
(15u p12:sp2 ph8):f2
5u groff
d16
(p1*2 ph4):f1
d16
5u gron2
(15u p12:sp2 ph9):f2
5u groff
d16

(p1 ph5)
d4
(center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
d17          ;=d4-p16
p16:gp6

(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
10u pl12:f2 cpd2:f2
;EPI
3      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
      lo to 3 times l4
      5u do:f2

rcyc=2
MCWRK wr #0 if #0 zd
;lo to LBLF1A times td1medio

;VENTANA 2
4      ze
      d2
5      MCWRK * 2
      LBLF1B, MCREST
      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD

```

```
;presaturacion
    #ifdef PRESATV2
        pv2, 5u fq4:f1
        ;;d12 pl9:f1
        ;;d3 cw:f1 ph29
        ;;d13 do:f1
        ;p14:sp14
        ;50u
;watergate w5
cv2, 50u UNBLKGRAD
p26:gp11
d26 pl18:f1
p27*0.087 ph13
d19*2
p27*0.206 ph13
d19*2
p27*0.413 ph13
d19*2
p27*0.778 ph13
d19*2
p27*1.491 ph13
d19*2
p27*1.491 ph14
d19*2
p27*0.778 ph14
d19*2
p27*0.413 ph14
d19*2
p27*0.206 ph14
d19*2
p27*0.087 ph14
50u
p26:gp11
d26
4u
p26:gp12
d26
p27*0.087 ph15
d19*2
p27*0.206 ph15
d19*2
p27*0.413 ph15
d19*2
p27*0.778 ph15
```

VII. Anexo A

```
d19*2
p27*1.491 ph15
d19*2
p27*1.491 ph16
d19*2
p27*0.778 ph16
d19*2
p27*0.413 ph16
d19*2
p27*0.206 ph16
d19*2
p27*0.087 ph16
p26:gp12
d26
4u BLKGRAD
lo to cv2 times 8

lo to pv2 times 2
#endif

;offset pulsos duros de f2 para la ventana 2
    5u fq2:f2
    d12 pl1:f1 pl2:f2

    (p1 ph1)
    d4
    (center (p1*2 ph7):f1 (p2*2 ph2):f2)
    d4
    (p1 ph3)

;excitacion selectiva
    5u gron1
    (15u p12:sp4 ph8):f2
    5u groff
    d16
    (p1*2 ph4):f1
    d16
    5u gron2
    (15u p12:sp4 ph9):f2
    5u groff
    d16

    (p1 ph5)
    d4
    (center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
```

```
d17          ;=d4-p16
p16:gp6
```

```
(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
```

```
10u pl12:f2 cpd2:f2
```

```
;EPI
6      p13:gp3
      d16
      p13:gp4
      d16
lo to 6 times l4
5u do:f2
```

```
rcyc=5
MCWRK wr #0 if #0 zd
;lo to LBLF1B times td1medio
```

```
lo to 1 times td1medio
d11 BLKGRAD
exit
```

```
ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=1
ph6=0
ph7=0 0 0 0 2 2 2 2
ph8=2 0
ph9=2 2
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph13=0 0 1 1 2 2 3 3
ph14=2 2 3 3 0 0 1 1
ph15=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3
ph16=2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1
ph29=0
ph30=0
ph31=2 0
```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p12 : f2 channel - 90 degree shaped pulse
;sp2 : f2 channel - power level for shaped pulse
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;d0 : incremented delay (2D)      [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O          [30 msec]
;d12: delay for power switching   [20 usec]
;d13: short delay                 [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;l4 : loop counter for acquisition loop (N2)
;td : =((l4*(2*(p13+d16)))/dw)[+6]
;fq1list : O1 for presat
;fq2list : O1 for f2 irradiation frequency
;fq3list : O1 for f1 irradiation frequency
;fq4list : O1 for f2 shaped pulse
;use gradient:
;gp1 : positive excitation z gradient (length = p12)
;gp2 : negative excitation z gradient (length = p12)
;gp3 : positive acquisition z gradient
;gp4 : negative acquisition z gradient
;p13 : acquisition gradient length
;gp5 : long purge gradient
;p15 : long purge gradient length [2000 usec]
;gp6 : short purge gradient
;p16 : short purge gradient length [200 usec]
;use gradient files:
;gpnam3 : RECT.1
;gpnam4 : RECT.1
;gpnam5 : SINE.100 / SINE.20
;gpnam6 : RECT.1

```

Programa de pulsos del experimento dinámico UF-HSQC Selectivo de tiempo constante: *CTgChsqcUF_Sel_DW.c*

/* gChsqcUF.c - single shot 2D HSQC experiment according to
L. Frydman, E. Kupce et al.
written on May 2004

Ref. L. Frydman et al, JACS, v. 125 p. 9204 (2003)

General Parameters:

pwC - duration of 90 degree C13 pulse at pwClvl
pwClvl - power level for hard C13 90 degree pulses
compC - C-13 amplifier compression factor
jCH - J(C13,H1) coupling constant
hsg - gradient strength for spoiler pulses (in G/cm)

UF-specific Parameters:

Ga - spatially resolved acquisition gradient strength (in G/cm)
Ge - spatial encoding gradient strength (in G/cm)
Gcal - gradient calibration factor (scaling G/cm to DAC units)
Gbalance - balance ratio between positive and negative gradients
Grec - gradient recovery delay, $\geq 2 \cdot \text{pwC}$
purge - purge pulse duration
dof_A or dof_B - offset for F1-encoding pulses

Note that Ga and N2 should not be set directly, but rather adjusted
via sw1, sw0, at1 and at0 parameters. Grec should be set $\text{Grec} = 2 \cdot \text{pwC}$

```
*/
#include <standard.h>
// #include <Pbox_UF.h>
#include "Pbox_UF_ksh_13C.h"

static shape sinc_90;

pulsesequance()
{
    Char          UFdecon[MAXSTR];
    double        ksh,
                  tau = 0.25/getval("jCH"),
                  purge = getval("purge"),
                  preacq_del = getval("preacq_del"),
//                  pwC = getval("pwC"),
                  pwClvl = getval("pwClvl"),
```

```
compC = getval("compC"),
ref90C = compC*pwC,
tof_A = getval("tof_A"),
tof_B = getval("tof_B"),
dof_A = getval("dof_A"),
dof_B = getval("dof_B"),
N2 = getval("N2"),
Grec = getval("Grec"),
Ge = getval("Ge"),
Ga = getval("Ga"),
// Gp = getval("Gp"),
Gcal = getval("Gcal"),/* 0.0021649 for HCN probe
                        0.0033 for normal diff probe
                        0.00671 for diff probe @ 20 Amps */
Gbalance = getval("Gbalance"),
gzlvl1 = (int) Ge/Gcal,
gzlvl2 = (int) Ga/Gcal,
// gzlvl3 = (int) Gp/Gcal,
// gzlvl3 = gzlvl2,
hsg = getval("hsg"),
hsglvl = (int) hsg/Gcal,
hsgt = getval("hsgt"),

spwsinc = getval("spwsinc"),
sbwsinc = getval("sbwsinc");

void makeshapes();

getstr("UFdecon",UFdecon);

// ksh = gzlvl2*(purge+getval("Ta")/2)*sfrq/dfrq; Original...
// ksh = gzlvl2*(1.0*purge + (getval("Ta")/2) )*sfrq/dfrq;
// factor of 0.6 centers the peak in F1 ----> ksh = gzlvl2*(purge+ (getval("Ta")/1.6666667)
// )*sfrq/dfrq;

ksh = gzlvl2*(purge + (getval("Ta")/2) )*sfrq/dfrq;

printf ("current value of ksh is: \".7f\"\\n", ksh);
// printf("current value of Ta is: \".7f\"\\n", Ta);
printf("current value of Purge is: \".7f\"\\n", purge);
printf("current value of gzlvl2 is: \".7f\"\\n", gzlvl2);
// ksh = 0.0;
// printf("current value of ksh is: \".7f\"\\n", ksh);

dbl(ct, v1); /* v1 = 0202 */
```

```

        hlv(ct, v2); /* 0011 */
        dbl(v2, v2); /* v2 = 0022 */
        add(v1, v2, oph); /* oph = 0220 */
        mod4(v1, v1); mod4(v2, v2); mod4(oph, oph);

// assign(zero, oph);
/*
    if(getval("ni") > 1)
    {
        printf("ni must be < 2. Aborting... \n");
        exit(0);
    }
*/
    If ((dm[A] == 'y') || (dm[B] == 'y') || (dm[C] == 'y'))
    {
        Printf("dm can not be used - use UFdecon flag instead. \n");
        psg_abort(1);
    }

    If (tau > 1)
    {
        printf("jCH probably set mistakenly to zero, resetting it to a reasonable value... \n");
        tau = 2.5e-3;
    }

    If (purge > (tau-rof1))
    {
        printf("the purge pulse cannot be longer than the inept delay. Aborting... \n");
        exit(0);
    }

    If (FIRST_FID)
    {
        (void) makeshapes(spwsinc, sbwsinc, tpwr, pw);
        sinc_90 = getRsh("sinc_90");
    }

/* pulses invoked below using: shaped_pulse("sinc_90",sinc_90.pw,v1,rof1,rof1); */

    status(A);
    rcvloff();
    rgradient('z', 0.0);
    pre_sat();
    obspower(tpwr);
    decpower(pwClvl);

```



```
        obsoffset(tof_A);
        decoffset(dof_A);
        txphase(v1);
        status(B);
        obspower(sinc_90.pwr);
printf ("current value of sinc_90.pwr is: \%.7f\\n", sinc_90.pwr);
        shaped_pulse("sinc_90",sinc_90.pw,zero,rof1,rof1);
        obspower(tpwr);
//      delay(tau - 2.0*rof1);
        delay(tau - 2.0*rof1 - sinc_90.pw/2.0); /* This kills the signal!! */
        simpulse(2*pw,2*pwC,zero,zero,rof1,rof1);
        obspower(sinc_90.pwr);
        delay(tau - 2.0*rof1 - sinc_90.pw/2.0);
        shaped_pulse("sinc_90",sinc_90.pw,one,rof1,rof1);
        obspower(tpwr);
        zgradpulse(hsglvl,2*hsgt);
        delay(1e-3);
        initval(0.0, v9);
// to remove phase cycling -->   decrgpulse(pwC,two,rof1,rof1);
        decrgpulse(pwC,v1,rof1,rof1);
        UFdec_double_chirp_ksh_NEGgb(gzlvl1, Gbalance, Grec, ref90C, pwClvl, zero, zero, ksh);
        decpower(pwClvl);
        decoffset(dof_A);

// to remove phase cycling -->   decrgpulse(pwC,two,rof1,rof1);
        decrgpulse(pwC,v2,rof1,rof1);
        zgradpulse(-0.6*hsglvl,1.2*hsgt);
        delay(0.8*hsgt);/* Added 0.8*hsgt adjustment. 15 June. Probably unnecessary! */
        delay(1e-3);
        obspower(sinc_90.pwr);
        shaped_pulse("sinc_90",sinc_90.pw,zero,rof1,rof1);
        obspower(tpwr);
        delay(tau - 2.0*rof1 - sinc_90.pw/2.0);
        simpulse(2*pw,2*pwC,two,zero,rof1,rof1);
        delay(tau-rof1-purge);
//      delay(tau-rof1-purge - preacq_del);
        obspower(-16.0);
        zgradpulse(gzlvl2, purge);
        status(C);

        If (UFdecon[A] == 'y') pbox_UFdecon("Cdec", pwC, pwClvl);

//      UF_acquire(gzlvl2, Gbalance, pwC*2.0, N2, v9);
        UF_acquire_dbl_window1(gzlvl2, Gbalance, pwC*2.0, N2, v9);
        If (UFdecon[A] == 'y') pbox_UFdecoff();
```

```

//}

// status(A);
    rcvroff();
    rgradient('z', 0.0);
    pre_sat();
    obspower(tpwr);
    decpower(pwClvl);
    obsoffset(tof_B);
    decoffset(dof_B);
    txphase(v1);

// status(B);
    obspower(sinc_90.pwr);
    printf("current value of sinc_90.pwr is: \"%.7f\\n\", sinc_90.pwr);
    shaped_pulse("sinc_90",sinc_90.pw,zero,rof1,rof1);
    obspower(tpwr);
// delay(tau - 2.0*rof1);
    delay(tau - 2.0*rof1 - sinc_90.pw/2.0); /* This kills the signal!! */
    simpulse(2*pw,2*pwC,zero,zero,rof1,rof1);
    obspower(sinc_90.pwr);
    delay(tau - 2.0*rof1 - sinc_90.pw/2.0);
    shaped_pulse("sinc_90",sinc_90.pw,one,rof1,rof1);
    obspower(tpwr);
    zgradpulse(hsglvl,2*hsgt);
    delay(1e-3);

initval(0.0, v9);

// to remove phase cycling -->   decrgpulse(pwC,two,rof1,rof1);
    decrgpulse(pwC,v1,rof1,rof1);
    UFdec_double_chirp_ksh_NEGgb(gzlvl1, Gbalance, Grec, ref90C, pwClvl, zero, zero, ksh);
    decpower(pwClvl);
    decoffset(dof_B);

// to remove phase cycling -->   decrgpulse(pwC,two,rof1,rof1);
    decrgpulse(pwC,v2,rof1,rof1);

    zgradpulse(-0.6*hsglvl,1.2*hsgt);
    delay(0.8*hsgt);/* Added 0.8*hsgt adjustment. 15 June. Probably unnecessary! */
    delay(1e-3);
    obspower(sinc_90.pwr);
    shaped_pulse("sinc_90",sinc_90.pw,zero,rof1,rof1);
    obspower(tpwr);
// delay(tau - 2.0*rof1);

```

```
        delay(tau - 2.0*rof1 - sinc_90.pw/2.0); /* This kills the signal!! */
        simpulse(2*pw,2*pwC,two,zero,rof1, rof1);
        delay(tau-rof1-purge);
//    delay(tau-rof1-purge - preacq_del);
        obspower(-16.0);
        zgradpulse(gzlvl2, purge);
//    status(C);

    if (UFdecon[A] == 'y') pbox_UFdecon("Cdec", pwC, pwClvl);

//    UF_acquire(gzlvl2, Gbalance, pwC*2.0, N2, v9);
    UF_acquire_dbl_window2(gzlvl2, Gbalance, pwC*2.0, N2, v9);
    if(UFdecon[A] == 'y') pbox_UFdecoff();
}
void makeshapes(spwsel, sbwsel, refpwr, refpw)
double spwsel, sbwsel, refpwr, refpw;
{
    char  cmd[MAXSTR];

    double  stepsize = getval("stepsize"),

           compH = getval("compH");

    if (stepsize < 0.1) stepsize=1.0;
/*    sprintf(cmd, "Pbox sinc_90 -w \"sinc90 %.1f/%.7f\" -s %.2f -p %.0f -l %.1f\n",
        sbwsel, spwsel, stepsize, refpwr, 1.0e6*refpw*compH);
*/
    sprintf(cmd, "Pbox sinc_90 -w \"sinc90 %.7f\" -s %.2f -p %.0f -l %.1f\n",
        sbwsel, stepsize, refpwr, 1.0e6*refpw*compH);

//    sprintf(cmd, "Pbox sinc_90 -w \"sinc90 %.7f/%.7f\" -s %.2f -p %.0f -l %.1f\n",
//    sbwsel, spwsel, stepsize, refpwr, 1.0e6*refpw*compH);

    system(cmd);
    printf("makeshapes: current value of sbwsel is: \"%.7f\"\n", sbwsel);
    printf("makeshapes: current value of spwsel is: \"%.7f\"\n", spwsel);
    printf("makeshapes: current value of refpwr is: \"%.7f\"\n", refpwr);
    printf("makeshapes: current value of refpw scaled is: \"%.7f\"\n", 1.0e6*refpw*compH);
// 1.0e6*
}
```

Programa de pulsos del experimento dinámico UF-TOCSY-HSQC modulado en amplitud: *uftocsyhsqcDYN.ucm*

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>
"d7=(d16-p2*2)"
"d17=d4-p20"
"d36=p2-p1"
"FACTOR1=(d9/(p6*115.112))/2+0.5"
"l1=FACTOR1*2"
define loopcounter td1medio
"td1medio = td1 * 0.5"
;TOCSY
1      ze
      d2
2      d1 BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d12 pl1:f1
      5u gron1
      p11:sp1 ph1
      5u groff
      d16
      5u gron2
      p11:sp1 ph2
      5u groff
      d16
;begin DIPSI2
      d12 pl11:f1
3      p6*3.556 ph23
      p6*4.556 ph25
      p6*3.222 ph23
      p6*3.167 ph25
      p6*0.333 ph23
      p6*2.722 ph25
      p6*4.167 ph23
      p6*2.944 ph25
      p6*4.111 ph23
      p6*3.556 ph25
      p6*4.556 ph23
      p6*3.222 ph25
      p6*3.167 ph23
      p6*0.333 ph25
      p6*2.722 ph23
```

```

        p6*4.167 ph25
        p6*2.944 ph23
        p6*4.111 ph25
        p6*3.556 ph25
        p6*4.556 ph23
        p6*3.222 ph25
        p6*3.167 ph23
        p6*0.333 ph25
        p6*2.722 ph23
        p6*4.167 ph25
        p6*2.944 ph23
        p6*4.111 ph25
        p6*3.556 ph23
        p6*4.556 ph25
        p6*3.222 ph23
        p6*3.167 ph25
        p6*0.333 ph23
        p6*2.722 ph25
        p6*4.167 ph23
        p6*2.944 ph25
        p6*4.111 ph23
lo to 3 times l1
;end DIPSI2
        d12 pl1:f1
        p1:f1 ph3
        p15:gp5
        d16
        (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
        4u DWELL_GEN:f1
4        p13:gp3
        d16
        p13:gp4
        d16
lo to 4 times l4
100u eoscp
5u ipp1 ipp2 ipp3 ipp23 ipp25 ipp29 ipp31
lo to 2 times l2
d11 wr #0 if #0 zd
;HSQC
5        ze
        d2
6        d1 BLKGRAD
        50u UNBLKGRAD
        d12 pl1:f1 pl2:f2

```

```

    (p1 ph11):f1
    d4
    (d36 p1*2 ph12) (p2*2 ph17):f2
    d4
    (p1 ph13):f1
    5u gron6
    (p12:sp2 ph18):f2
    5u groff
    d16
    (p1*2 ph14):f1
    d16
    5u gron7
    (p12:sp2 ph19):f2
    5u groff
    d16
    (p1 ph15):f1
    d4
    (d36 p1*2 ph16) (p2*2 ph20):f2
    d17
    p20:gp10
    d16
    (de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
    RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
    4u DWELL_GEN:f1
    10u pl12:f2 cpd2:f2
7    p18:gp8
    d16
    p18:gp9
    d16
    lo to 7 times l4
    5u do:f2
    100u eosnp
    5u ipp0 ipp11 ipp12 ipp13 ipp14 ipp15 ipp16 ipp17 ipp18 ipp19 ipp20 ipp29 ipp31
    lo to 6 times ns
    d11 wr #0 if #0 zd
    lo to 1 times td1medio
    d11 BLKGRAD
    exit
    ph0=0
    ph1=0 2
    ph2=2 2
    ph3=0
    ph11=0
    ph12=0
    ph13=1

```

VII. Anexo A

ph14=0
ph15=1
ph16=0
ph17=0 0 0 0 2 2 2 2
ph18=0 2
ph19=2 2
ph20=0 0 0 0 2 2 2 2
ph23=3
ph25=1
ph29=0
ph30=0
ph31=0 2

Programa de pulsos del experimento dinámico ^1H , ^{31}P UF-HMBC modulado en amplitud: *ufPRhsqcDYN_ND_DW.ucm*

```
; ufPRhsqcDYN_ND_DW.ucm
;avance-version (05/10/24)
;single scan H-C shift correlation

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
#include <De.incl>

;"d0=in0*0.5 - p2*0.637 - p1" ; for F1 phase ph0 90 ph1 -180
;"d11=31m"
"d12=20u"
"d13=3u"
;"d7=0.5*(d16-p2*2)"
"d17=d4-p16"

1      ze
2      d11
      50u BLKGRAD
      50u UNBLKGRAD
      d1

;presaturacion cw
      d12 fq1:f1
      d12 pl9:f1
      d29 cw:f1 ph29
      4u do:f1
      d12 fq=0:f1
      d12 pl1:f1 pl2:f2

;inept
      (p1 ph1):f1
      d4
      (center (p2*2 ph7):f2 (p1*2 ph2):f1)
      d4
      (p1 ph3):f1

;excitacion selectiva
      5u gron1
      (p12:sp2 ph8):f2
      5u groff
      d16
```



```
(p1*2 ph4):f1
d16
5u gron2
(p12:sp2 ph9):f2
5u groff
d16
```

```
d12 pl1:f1 pl2:f2
(p1 ph5):f1
d4
(center (p1*2 ph6):f1 (p2*2 ph10):f2)
d17      ;=d4-p16
p16:gp6
d16
```

```
(de1 rde1 adc ph31 syrec) (de2 rde2 ph30:r):f1 (derx rderx RGP_RX_ON) (deadc rdeadc
RGP_ADC_ON) (depa rdepa RGP_PA_ON) (de)
4u DWELL_GEN:f1
;10u pl12:f2
;5u cpd2:f2
```

```
;EPI
7 p13:gp3
d16
p13:gp4
d16
lo to 7 times l4
```

```
rcyc=2
30m mc #0 to 2 F0(zd)
d11 BLKGRAD
exit
```

```
ph0=0
ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph7=0
ph8=0 2
ph9=2 2
ph29=0
ph28=0
ph10=0
```

```
ph30=0
ph31=0 2

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - 90 degree shaped pulse
;sp2 : f2 channel - power level for shaped pulse
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;d0 : incremented delay (2D)      [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O          [30 msec]
;d12: delay for power switching   [20 usec]
;d13: short delay                 [3 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;l4 : loop counter for acquisition loop (N2)
;td : =((l4*(2*(p13+d16)))/dw)[+6]
;fq1list : O1 for presat
;fq2list : O1 for f2 irradiation frequency
;fq3list : O1 for f1 irradiation frequency
;fq4list : O1 for f2 shaped pulse
;use gradient:
;gp1 : positive excitation z gradient (length = p12)
;gp2 : negative excitation z gradient (length = p12)
;gp3 : positive acquisition z gradient
;gp4 : negative acquisition z gradient
;p13 : acquisition gradient length
;gp5 : long purge gradient
;p15 : long purge gradient length [2000 usec]
;gp6 : short purge gradient
;p16 : short purge gradient length [200 usec]
;use gradient files:
;gpnam3 : RECT.1
;gpnam4 : RECT.1
;gpnam5 : SINE.100 / SINE.20
;gpnam6 : RECT.1
```

Anexo B

Publicaciones

A continuación se incluyen algunas de las publicaciones de los resultados que se derivan de la presente memoria.

Monitoring Mechanistic Details in the Synthesis of Pyrimidines via Real-Time, Ultrafast Multidimensional NMR Spectroscopy

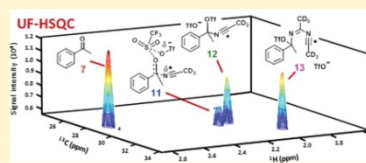
Zulay D. Pardo,[‡] Gregory L. Olsen,[‡] María Encarnación Fernández-Valle,[§] Lucio Frydman,^{*,†} Roberto Martínez-Álvarez,[‡] and Antonio Herrera^{*,‡,§}

[†]Department of Chemical Physics, Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel

[‡]Departamento de Química Orgánica I and [§]CAI de RMN y RSE, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Recent years have witnessed unprecedented advances in the development of fast multidimensional NMR acquisition techniques. This progress could open valuable new opportunities for the elucidation of chemical and biochemical processes. This study demonstrates one such capability, with the first real-time Two-dimensional (2D) dynamic analysis of a complex organic reaction relying on unlabeled substrates. Implementing such measurements required the development of new ultrafast 2D methods, capable of monitoring multiple spectral regions of interest as the reaction progressed. The alternate application of these acquisitions in an interleaved, excitation-optimized fashion, allowed us to extract new structural and dynamic insight concerning the reaction between aliphatic ketones and triflic anhydride in the presence of nitriles to yield alkylpyrimidines. Up to 2500 2D NMR data sets were thus collected over the course of this nearly 100 min long reaction, in an approach resembling that used in functional magnetic resonance imaging. With the aid of these new frequency-selective low-gradient strength experiments, supplemented by chemical shift calculations of the spectral coordinates observed in the 2D heteronuclear correlations, previously postulated intermediates involved in the alkylpyrimidine formation process could be confirmed, and hitherto undetected ones were revealed. The potential and limitations of the resulting methods are discussed.



1. INTRODUCTION

Heterocycles' significance is central in modern chemistry.¹ Among nitrogen-containing heterocycles, pyrimidines play unique roles as integral constituents in many pharmaceutical, functional, and natural materials.² Understanding and controlling laboratory preparations of pyrimidinic derivatives have therefore become an important field of synthetic chemistry.³ Recently we focused our attention on one-pot syntheses of various heterocyclic derivatives and developed alternatives for an easier preparation of a wide range of azaheterocyclic compounds.⁴ Other elegant procedures have been also described for the synthesis of pyrimidine derivatives⁵ and oxazoles.⁶ Several of these studies revealed details of the mechanism of pyrimidine formation when reacting carbonyl compounds with strong electrophiles, such as trifluoromethanesulfonic acid anhydride (triflic anhydride, Trf_2O).⁷ Still, despite the importance of these reactions, large gaps in knowledge remain about the variety of intermediates and mechanistic routes involved in their formation, and key details about the structural information associated to the kinetics of these processes remain to be elucidated.

Real-time NMR measurements could open unique opportunities in the analysis of complex chemical problems such as this one. Two-dimensional (2D) NMR, in particular, could enable one to monitor and assign transient intermediates in the

reaction as well as to quantify their overall kinetics of formation. Doing so, however, requires completing the 2D NMR measurement in time scales compatible with the chemical changes occurring following a sudden triggering of the reaction. Much progress has taken place during recent years in the area of accelerating multidimensional NMR—both in the areas of organic and biomolecular acquisitions. Efforts that have made 2D spectroscopy compatible with the tracking of rapid transformations include Hadamard-encoded versions of heteronuclear (HSQC) and homonuclear (TOCSY) NMR exploiting a priori information,⁸ compressed sensing acquisitions where the usual Nyquist demands for the FT-based sampling of a NMR domain can be alleviated,⁹ and so-called “ultrafast” (UF) acquisition schemes whereby arbitrary 2D NMR correlations can be established in a single-scan fashion.¹⁰ The latter approach in particular replaces the indirect-domain parametric time encoding of 2D NMR with a spatiotemporal manipulation, effectively imparting all the increments that would be involved in a conventional experiment—in their entirety—within one single scan.¹¹ The spatial patterns imparted by indirect domain evolution frequencies encoded in such a manner can be subsequently read out with the aid of suitable magnetic field

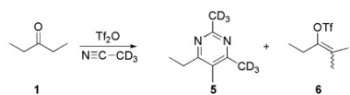
Received: October 28, 2011

Published: January 4, 2012

gradients. Using such rapid acquisition 2D NMR methods, a number of fast-reacting systems have been recently monitored in real time. These have included biomolecular single- and multiple-quantum heteronuclear correlations (HSQC and HMQC) on proteins and nucleic acids¹² as well as TOCSY and multiple-bond correlation experiments on reacting organic systems.^{15a} Included among the latter were studies on the synthesis of alkyl- and alkylaryl-pyrimidines from aliphatic and aromatic ketones, whereby series of complete 2D NMR data sets were collected on 100% abundant isotopes to observe the changes in chemical species occurring as the reactions progressed.

We have recently studied these reactions for the specific case of the addition of 3-pentanone **1** to acetonitrile-*d*₃ in the presence of triflic anhydride (Scheme 1). In these studies 2D

Scheme 1



ultrafast TOCSY homonuclear acquisitions revealed the presence of intermediates **2–4**, and the generation of the final reaction products **5** and **6** was revealed (Scheme 2).^{13b} Two-dimensional ultrafast heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy (HMBC) experiments on specifically labeled precursors were also implemented to elucidate the chemical nature and evolution of reactive quaternary centers involved in this reaction. Upon monitoring a similar condensation that starting from ¹³C-carbonyl-labeled acetophenone **7** lead to alkylaryl-pyrimidine **9** as main product (Scheme 3), such experiments permitted the detection of the intermediate (trifluoromethylsulfonyloxy)carbenium ion **8**.^{13c}

Unfortunately, label-based experiments such as these have a narrow focus that may obscure a full and unambiguous identification of all transient intermediates generated during the course of the reaction. To extract such important mechanistic information, it would be necessary to implement more general 2D NMR correlations. Particularly useful could be site-identifying heteronuclear correlations covering the full possible range of chemical shifts that might arise, so that both permanent as well as transient species can be characterized. Running ultrafast HSQC experiments at natural abundance in non-labeled samples, however, would not be a trivial endeavor. Indeed in single scan sequences, the spectral widths SW_2 and SW_1 along the directly and indirectly sampled dimensions are related to one another. Moreover these parameters as well as the effective spectral resolution $\Delta\nu_1$ desired along the indirect domain define the gradient strength G_z required to read out the indirect domain spectral width according to $(SW_1SW_2)/(\Delta\nu_1) \sim \gamma_z G_z L$, where L is the encoded sample length. The per scan

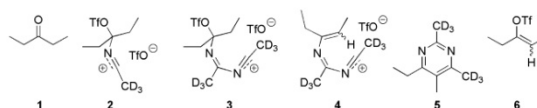
signal-to-noise ratio (SNR) is in turn also governed by the $\gamma_z G_z L$ frequency span, which becomes the filter bandwidth that needs to be used for this kind of measurement. Noise in this kind of experiment thereby behaves proportionally to $\sqrt{(SW_1SW_2)/\Delta\nu_1}$. For the kind of HSQC and HMBC experiments that would be needed to characterize a priori unknown intermediates that can fall anywhere in the aliphatic/olefinic/aromatic range, as is the case for the kind of reaction depicted in Scheme 3, this relation would impose high strains on the gradient strengths that would be necessary (≈ 80 G/cm for covering an indirect domain spanning ≈ 150 ppm, a direct domain of ≈ 4 kHz, and the typical 1.8 cm sample length). Even worse, the associated noise penalties would become untenable for the ensuing kind of filter bandwidths.

One of the aims of this work consisted in developing a methodology which would allow us to monitor the necessary spectral widths while bypassing such stringent demands. Strategies have been discussed in the recent literature capable of alleviating the gradient strengths needed to decode a given spectral bandwidth in single-scan 2D NMR, including the folding of peaks along the direct and indirect domain as well as shifting of peaks into a single, congruent band of detection.¹⁴ In the present instance, however, we decided to explore an alternative route that, while still alleviating the gradient's demands, could still furnish a direct reading of the chemical shift information about the transient reaction intermediates. To do so a new family of experiments was devised incorporating (i) the selective excitation of different spectral bands of interest (aliphatic, olefinic, aromatic) and (ii) the interleaving of real-time ultrafast acquisitions targeting these spectral bands through consecutive scans. With the aid of such strategies it was possible to interrogate the nature of the chemical dynamics in Scheme 3 using unlabeled compounds, recording literally thousands of 2D heteronuclear correlation spectra within the course of these hour-long processes. With the aid of such data, of ancillary 1D NMR measurements, and of computer-based estimators of chemical shift values, new transient intermediates were detected, and their kinetics of generation/consumption characterized. All this led us to propose a new two-pathway mechanism for the triflate-mediated addition of acetonitrile-*d*₃ to arylketones.

2. MATERIALS AND METHODS

To address the spectral-width/spectral-resolution issues just mentioned, we decided to attempt the observation of the reaction in Scheme 3 at natural abundance by modifying a general, broadband heteronuclear correlation experiment, into a multiple-window observation mode. In other words, instead of implementing ultrafast sequences covering in excess of 100 ppm in the ¹³C domain, the targeted direct- and indirect-domain windows were split into regions expected to possess the peaks of interest. Areas that were a priori, known to be devoid of peaks, were consequently ignored. Moreover, these multiple spectrally selective versions of single-bond heteronuclear correlation ultrafast sequences were run in an interleaved fashion so as to employ the relaxation recovery delay of one spectral

Scheme 2



Scheme 3

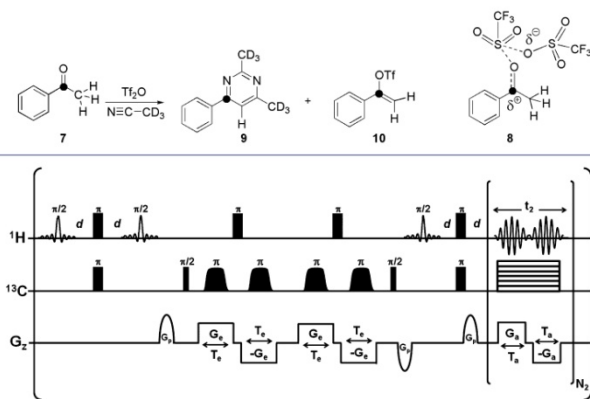


Figure 1. Multiwindowed ultrafast HSQC pulse sequence involving: a selective excitation of protons in the targeted spectral window; an INEPT magnetization transfer to carbon; four chirped pulses applied in the presence of suitable gradients and $(\pi)^H$ decoupling pulses to give a constant-time spatial encoding of the carbon evolution; a selective transfer of this encoded information to protons; and low-strength $\pm G_x$ gradient pairs acting as read-out of the resulting encoded signals. After shifting the irradiation frequencies to a second spectral window, the sequence is then immediately repeated to acquire a second FID addressing a different spectral region. Selective excitation and spatial encoding used 1.42 ms sinc $\pi/2$ pulses and 2.5 ms π chirp pulses, respectively. Encoding gradient strengths were 25 G/cm. Read out of encoded signals typically used $N_2 = 40$ cycles and a G_x of 6.35 or 10.6 G/cm. The narrow independent windows targeting specific spectral regions of interest permits use of these low-strength gradients, providing corresponding increases in SNR and enabling the detection of nonlabeled samples.

region to collect the data pertaining to another spectral region—very much like multislice imaging experiments perform their optimized acquisitions in frequency-shifted 3D MRI.¹⁵ To do so in the ultrafast instances, care had to be made to either avoid the excitation of ^1H signals outside the targeted region or, alternatively, to make sure that unencoded regions were addressed by an even number of $(\pi)^H$ rotations so as to return their magnetizations to a relaxation-optimized longitudinal state. (^{13}C manipulations being less critical for all cases given that ^1H initiated, indirectly detected sequences were assayed.) Three spectral windows were selected for these observations, usually involving ≈ 1.5 ppm along the ^1H and ≈ 10 – 20 ppm along the ^{13}C dimension. These windows encompassed: (i) an ‘aliphatic’ region centered at 2.2 ppm (^1H) and 28.7 ppm (^{13}C); (ii) an ‘olefinic’ region at 5.8 ppm (^1H) and 110.9 ppm (^{13}C) set to follow transient intermediates; and (iii) an aromatic ‘pyrimidinic’ region centered at 8.2 ppm (^1H) and 117.4 ppm (^{13}C) to track formation of the final reaction product 2,4-dimethyl-6-phenylpyrimidine- d_6 (9). A typical scheme of these pulse sequences is illustrated in Figure 1. This consists of a series of back-to-back heteronuclear correlations involving two continuous constant-time spatial encoding processes for monitoring the indirect domain ^{13}C evolution. As each one of these additive processes involved a $(\pi)^H$ decoupling pulse in their center, no overall rotation of the proton magnetizations resulted from the t_1 period. The two INEPT transfers in each of these sequences incorporated sinc $(\pi/2)^H$ excitations and two hard $(\pi)^H$ pulses, thereby fulfilling the band-selectivity requirements of these sequences. These multiwindowed constant-time ultrafast 2D NMR data sets were collected on a Varian VNMRs 600 MHz NMR spectrometer using a triply tuned HCN single-gradient probe at 298 K. The constant-time spatial encoding adiabatic $(\pi)^C$ pulses needed for the spatial encoding were generated using the Varian Pbox software package, with these chirped pulses sweeping a bandwidth $[O_1-O_2] = 49\,519$ Hz in 2.5 ms, applied in conjunction with 25 G/cm encoding gradients. All protons were selectively excited in their appropriate bandwidths with 1.42 ms long, 1 kHz bandwidth $(\pi/2)^H$ pulses. All experiments used 180° phase

cycling of both the initial $(\pi/2)^C$ hard pulse and the receiver phase, for ensuring a more complete suppression of the natural abundance background. Acquisitions used gradient strengths of $G_x = 6.35$ or 10.6 G/cm and filter bandwidths of either 25 or 42 kHz (as noted in the text). Further acquisition parameters included $N_2 = 40$ cycles of \pm gradient pairs, a physical sampling dwell time of $2\ \mu\text{s}$, and gradient durations $T_g = 0.60$ ms each. Square $(\pi)^C$ pulses were applied in between all acquisition gradients for heteronuclear decoupling purposes. Purge gradient pulses preceding acquisition were 1.60 ms in duration, at 6.35 G/cm (10.6 G/cm for the experiment using labeled starting material (7) to probe the olefinic region).

The reaction described in Scheme 3 was initially monitored using spectral windows spanning 800.8 Hz in ^1H and 2500 Hz in ^{13}C . To permit an enhanced sensitivity, the ^{13}C window sizes were further reduced to 1500 Hz in subsequent tests. Gradients and bandwidths were adjusted accordingly, as noted below. Each 0.5 mL acetophenone-acetonitrile solution was pretuned and preshimmed prior to injection of a small aliquot ($\approx 56\ \mu\text{L}$) of Tl_2O . A mixing device was used for this injection, including a syringe feeding directly into the NMR tube inside the magnet (see Supporting Information). Data collection was initiated prior to injection of Tl_2O . Preliminary tests monitoring ^{13}C -labeled acetophenone (7) used two scans per 2D spectrum. Reactions monitoring unlabeled acetophenone (7) were acquired using 12 scans per FID and a four-step phase cycle, again with 180° phase cycling of both ^{13}C $\pi/2$ pulses and of the receiver phase. Each double-window HSQC data set thus required 4.16 s per scan when using the 2 s recycle delay. Total times per 2D spectrum were 8.32 and 49.9 s for monitoring of labeled and nonlabeled reactants, respectively. This back-to-back application of separate ultrafast HSQC experiments, targeting different windows of interest, permitted the parallel observation of multiple spectral windows in the same real-time acquisition batch. While as many as four distinct spectral regions were monitored in certain runs, only two windows per experiment (Figure 1) are presented in this work. The resulting concatenated time-domain signals were separated into FIDs corresponding to the individual

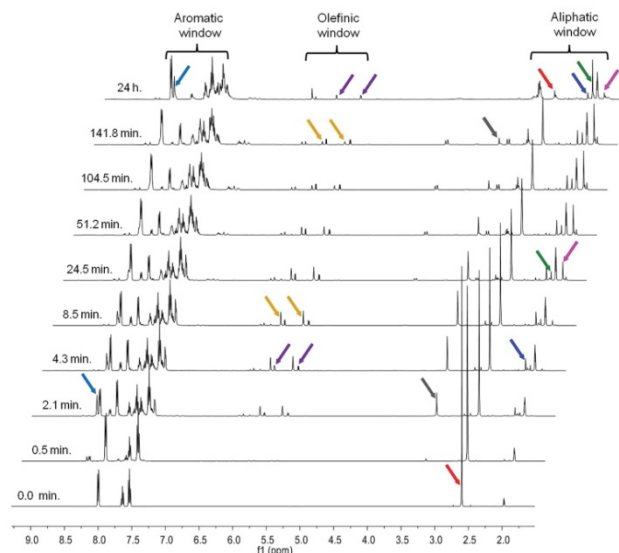


Figure 2. Real-time 1D ^1H NMR series recorded as a function of time (only a small subset of the resulting spectra hereby shown). Colored arrows show the positions of specific signals from products and intermediates participating in the reaction between acetophenone (**7**) (0.183 mmol) and triflic anhydride (0.275 mmol) in acetonitrile- d_3 (as both a coreactant and solvent) at 298 K. The red arrow at (2.60 ppm, 0.0 min) indicates the signal of methyl group from starting acetophenone. Light-blue and purple arrows show signals from final products, aromatic proton H-5 (8.32 ppm, 2.1 min) in pyrimidine (**9**), and the methylene protons (5.85 and 5.49 ppm, 51.2 min) in vinyl triflate (**10**), respectively. Gray (3.28 ppm), blue (2.11 ppm), green (2.04 ppm), and magenta (1.87 ppm) arrows represent the position of methyl group in different aliphatic intermediates; gold (5.90/5.57 ppm) arrows present the positions of methylene protons from olefinic intermediates as well.

INTEGRAL VS. TIME

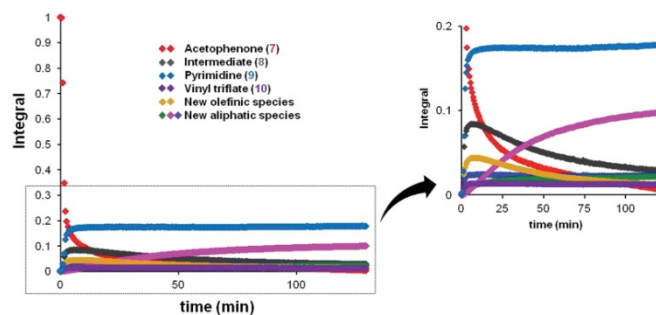


Figure 3. Normalized integrals as a function of time, taken from the real-time 1D ^1H NMR series shown in Figure 2. The integrals were measured by taking the characteristic signals for the initial ketone (**7**, red), the final pyrimidine (**9**, light blue), vinyl triflate (**10**, purple), and the intermediate (**8**, gray) as well as for other new intermediates detected in these studies. The right-hand panel presents an expanded description of these compounds' time dependencies.

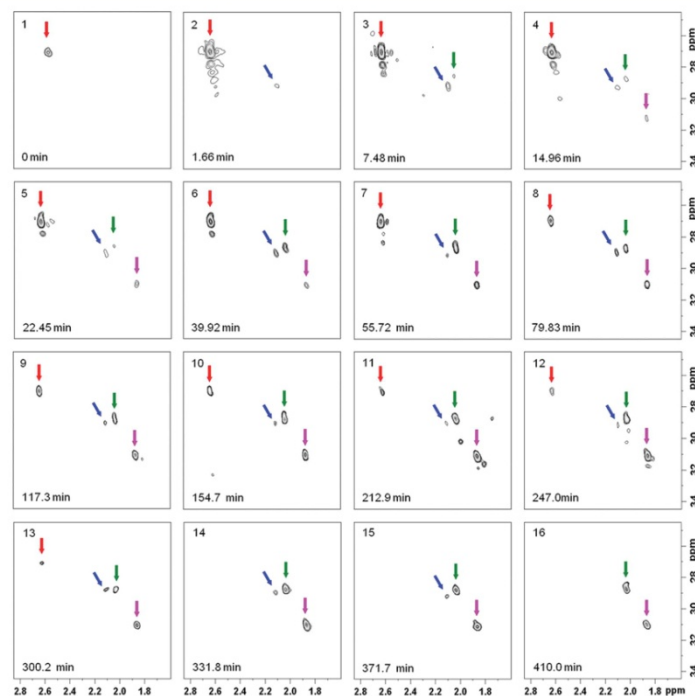


Figure 4. Representative selection of real-time 2D HSQC NMR spectra arising from the reaction of triflic anhydride, ketone (**7**) and acetonitrile- d_3 . Spectra show species (**7** and **11–13**) present in the aliphatic window range (1.54–2.87 ppm for ^1H , 23.7–33.7 ppm for ^{13}C) at key time points as the reaction progressed, depicted by arrows (red, blue, green, and magenta, respectively) (see text for further details).

windows, then processed into 2D spectra in the usual ultrafast fashion, and characterized using custom-written Matlab scripts. To aid in the elucidation of the reaction intermediate structures, ^1H NMR chemical shifts were estimated using Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Laboratories) Software V8.0, and ^{13}C NMR shifts were calculated within the GIAO approximation¹⁶ on the PCM-M06-2X/6-31+G* (solvent = acetonitrile)^{17,18} with optimized geometries using the Gaussian 09 suite of programs.¹⁹

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Real-Time 1D Measurements. A variety of preliminary 1D ^1H NMR data were taken to delineate the spectral windows to be used for the main 2D studies. Figure 2 illustrates a representative set of such tests. In addition to signals corresponding to reagents and products (Scheme 3), these tests revealed over a dozen transient signals in the ^1H aliphatic and olefinic regions. These signals—arising on top of the ^1H NMR resonances belonging to reagents and products—suggest the presence of a number of candidate aliphatic and olefinic intermediates that had not been previously noticed. Aliphatic intermediates will be characterized by singlet signals from methyl group present, whereas olefinic intermediates will

show doublets produced by the diastereotopic protons from the methylene group. Figure 3 presents a more quantitative description on the appearance and disappearance of these different species, showing the time-dependent intensities of products **7**, **9**, and **10** as well as of intermediate **8** (cf. Scheme 3). Also shown is the kinetic behavior of an additional number of aliphatic and olefinic intermediates arising during the reaction.

3.2. Ultrafast 2D Heteronuclear Correlations. The identities of the intermediates involved cannot be determined exclusively from 1D ^1H NMR experiments. To obtain structural insight into these peaks, real-time ultrafast NMR techniques correlating data from ^1H and ^{13}C nuclei were recorded. Based on the temporal series of ^1H NMR experiments, three different spectral windows were selected for examination by real-time 2D NMR. One focused on an aliphatic region: 1.54–2.87 ppm for ^1H with 23.7–33.7 ppm for ^{13}C ; another in an olefinic one: 5.17–6.50 ppm for ^1H with 106.0–116.0 ppm for ^{13}C ; and a third in an aromatic/pyrimidinic one: 7.49–8.81 ppm for ^1H with 112.40–122.40 ppm for ^{13}C . A series of UF-HSQC spectra was taken for each window of interest; they are

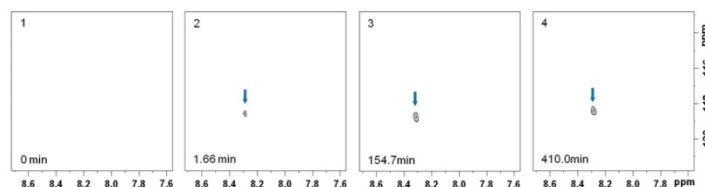


Figure 5. Representative selection of the real-time 2D HSQC NMR spectral series arising from the reaction of triflic anhydride, ketone (**7**), and acetonitrile- d_3 . Spectra taken as the reaction progressed show a cross peak (blue arrow) in the aromatic/pyrimidinic window range (7.49–8.81 ppm for ^1H , 112.40–122.40 ppm for ^{13}C) arising from the H5–C5 single bond of the pyrimidine (**9**, light-blue arrow) (see text for further details).

illustrated in Figures 4 and 5. Colored arrows in these plots denote cross-peaks representing reagents, products, and intermediates that participate in the reaction. Cross-peaks assigned to starting ketone (**7**) and final products vinyl triflate (**10**) and pyrimidine (**9**) were confirmed by 1D and 2D spectra (see the Supporting Information). Values of chemical shifts of highlighted (bold) nuclei are shown in Scheme 4.

Scheme 4

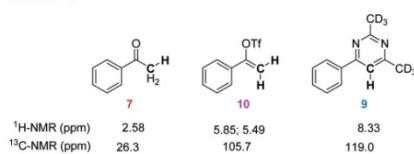


Figure 4 illustrates a series of representative 2D UF-HSQC spectra recorded for the aliphatic window at ca. 30 s delay. A total of 500 HSQC spectra was taken in a typical kinetic progression, where data acquisition was begun immediately prior to the sudden addition of triflic anhydride to a solution of ketone (**7**) in acetonitrile- d_3 (Figure 4 highlights only 16 of these, a full 3D animation made from the total set of HSQC experiments is given as Supporting Information). Prior to the TiF_3O injection, the cross-peak of the methyl group of (**7**) is clearly observed (0 min, red arrow). 1.66 min after initiation of the reaction a new cross-peak at $\delta = 2.09/28.40$ ppm (blue arrow) is seen. Then, at ca. 7.48 and 14.97 min, two additional

cross-peaks at 2.02/28.10 ppm (green arrow) and 1.82/30.30 ppm (magenta arrow), respectively, were clearly detected. The intensity of these cross-peaks changed with time, rising and falling during the course of the reaction (see Figure 6).

A series of representative 2D UF-HSQC spectra were recorded in succession on the olefinic window (5.17–6.50 ppm, ^1H ; 106.0–116.0 ppm, ^{13}C) and on the aromatic/pyrimidinic region (7.49–8.81 ppm, ^1H ; 112.4–122.4 ppm, ^{13}C). Throughout the series of 500 HSQC spectra recorded in these windows, doublet cross-peaks from vinyl triflate (**10**) and olefinic intermediates were not detected. Figure 5 illustrates the 2D heteronuclear correlation observed for the aromatic/pyrimidine window. The spectra for this window are dominated by a cross-peak (8.33/119.0 ppm, light blue arrow) which appears with variable intensity in the aromatic region, corresponding to the H5–C5 single-bond of the pyrimidine (**9**). Its assignment to the pyrimidine (**9**) was confirmed independently by 1D and 2D standard NMR analyses. Figure 6 summarizes the time-evolution of key cross-peaks observed in the various windows studied. The aliphatic window (left) shows the kinetic behavior for reagent acetophenone (**7**) and intermediates (**11**), (**12**), (**13**). The aromatic window (right) reflects the formation of final product pyrimidine (**9**). (A 3D animation showing the complete time-series of spectra for the aromatic window is available for download as Supporting Information).

To further examine the olefinic window, the experiment was repeated with labeled ^{13}C -carbonyl-acetophenone (**7**) as the reagent. A spectral window targeting 5.17–6.50 ppm for ^1H and 102.6–119.2 ppm for ^{13}C permitted the observation and

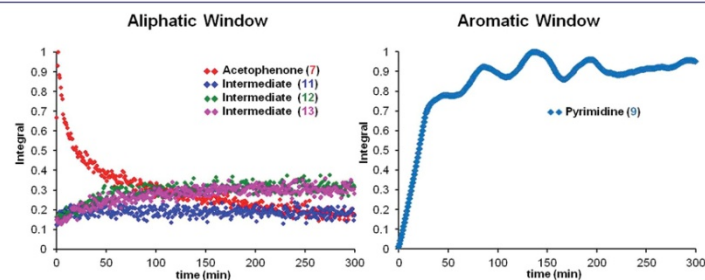


Figure 6. Integral values versus time-evolution of key cross-peaks as observed for the aliphatic and the aromatic windows studied.

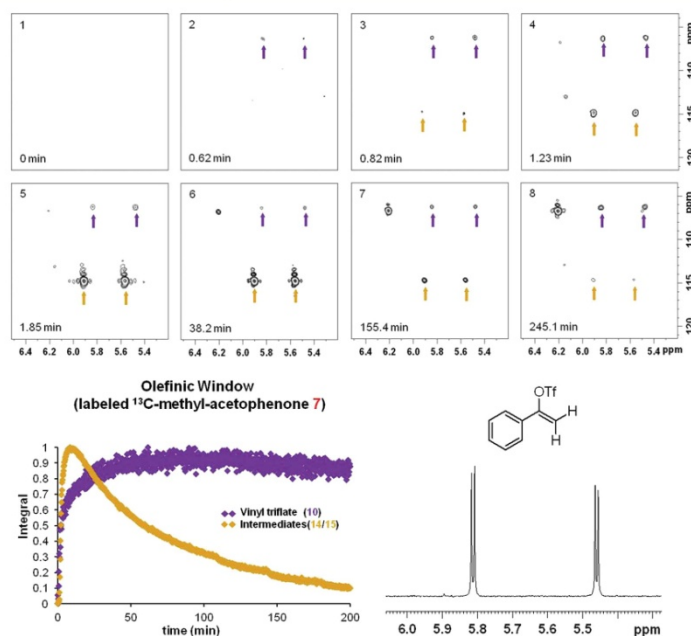


Figure 7. Representative selection of real-time 2D HSQC NMR spectra arising from the reaction of triflic anhydride, labeled ¹³C-methyl-acetophenone (7), and acetonitrile-*d*₃. Spectra show species (10) and (14/15) present for the olefinic window range (5.17–6.50 ppm ¹H, 102.6–119.2 ppm ¹³C) indicated by purple and dark-yellow arrows, respectively (top). The left bottom panel shows the time-dependent peak intensities (integrals) of the vinyl triflate (10) and the newly found intermediates (14/15) which represent the variation in their respective concentrations during the course of the reaction. The right bottom panel shows the olefinic peaks in a ¹H NMR spectrum of isolated and purified vinyl triflate.

comparison of olefinic products and intermediates. A total of 1200 HSQC spectra taken under these conditions within the course of the reaction revealed, in addition to the expected doublet of cross-peaks from vinyl triflate (10, purple arrow), a new doublet of cross-peaks (Figure 7). The rise and fall of these cross-peaks (dark-yellow arrows) show its character as intermediate. Figure 7 (bottom) also displays the kinetic behavior of the new olefinic intermediates (14) and/or (15). Additionally the presence of a time-increasing cross-peak at 6.20/106.5 was observed. As seen in Figure 7, the kinetics of the vinyl triflate (10) are in good agreement with those seen initially in the nonlabeled reaction. For a 3D animation see the Supporting Information.

4. DISCUSSION

The time-evolution of the peak intensities observed in the various real-time 1D and 2D spectra illustrated in the preceding section suggest a complex sequence of events underlying the evolution of the starting acetophenone (7) to the final pyrimidine (9). A mechanism capable of rationalizing all the observed peaks is depicted in Figure 8. The HSQC series recorded on the 1.54–2.87 ppm, ¹H, and 23.7–33.7 ppm, ¹³C aliphatic window, indicates that the reaction starts with an

electrophilic attack of the S-atom of one of the SO₂ groups of triflic anhydride on the O-atom of the carbonyl group of acetophenone (7) leading to the rapid formation of an intermediate (8), whose presence we have detected in the past by ultrafast 2D HMBC experiments,^{13c,20} but whose cross-peaks fall outside the window targeted here. Evolution of (8) by nucleophilic capture by acetonitrile-*d*₃ leads to the complex (11), which evolves to the nitrilium-salt intermediate (12).^{21,22} The reaction continues, and an additional nucleophilic capture by the acetonitrile-*d*₃ takes place forming intermediate (13). In order to confirm these intermediates, measurements were repeated using labeled ¹³C-methyl-acetophenone (7) and a standard UF-HSQC sequence,²³ which permits monitoring of (examination) an expanded acquisition window (4.50–0.50 ppm, ¹H; 63.60–3.60 ppm, ¹³C). These results from monitoring of the methyl labeled reactant (7) confirmed the formation of intermediate (8) and its evolution to intermediates (11–13) (Figure 9).

Elimination of triflic anhydride from intermediate (8) would lead to vinyl triflate (10), which should form as a side product. Cross-peaks from (10) and/or from other possible olefinic intermediates like (14), however, were not observed in the HSQC of the olefinic window (5.17–6.50 ppm, ¹H; 106.0–

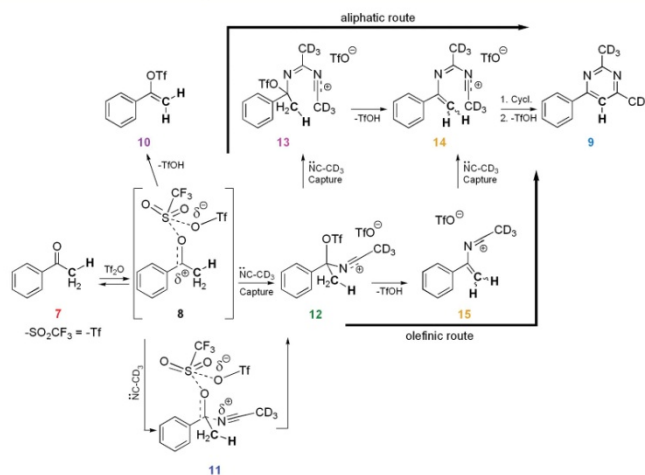


Figure 8. Proposed mechanism for the reaction of triflic anhydride, acetophenone (7), and acetonitrile- d_3 in accordance with the structural and kinetic insight gained from the ultrafast NMR experiments. The NMR results suggest two possible routes (an aliphatic and an olefinic) that can yield the final product (9) of the reaction.

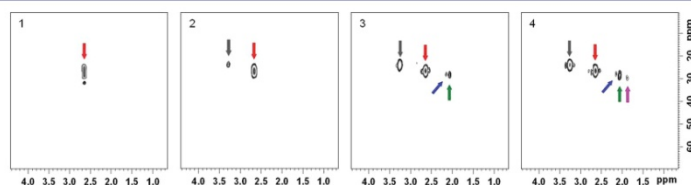


Figure 9. Representative series of real-time 2D HSQC NMR spectra recorded for the aliphatic window of a reaction between labeled ^{13}C -methyl-acetophenone (7, red arrow) with triflic anhydride and acetonitrile- d_3 . From the crosspeaks detected by the UF-HSQC sequence in this spectral window, the formation of the intermediate (8, gray arrow) and its evolution to the intermediates (11, blue arrow), (12, green arrow), and (13, magenta arrow) can be monitored (see text for further information).

116.0 ppm, ^{13}C) starting from the unlabeled acetophenone (7). Still, intermediate (14) must also participate in the reaction,^{7b} by elimination of triflic acid in intermediate (13). This would lead to the formation of the crucial double bond present in (14), in whose absence the cyclization step which leads to the pyrimidine ring cannot take place. Suspecting that these intermediates could not be seen due to a transient nature leading to maximal concentrations below our sensitivity limits, reactions were repeated using labeled ^{13}C -methyl-acetophenone (7) and the olefinic window revised with this aid (Figure 7). The results show the expected double cross-peaks from vinyl triflate (10) as well as a new pair of cross-peaks representing diastereotopic protons of a methylenide group (purple and dark-yellow arrows in Figure 7). We ascribe this new peak's origin to the triflate salt intermediates olefinic (14) and/or (15) containing two and one molecules of the nucleophilic acetonitrile- d_3 , respectively. Cross-peaks from intermediates (14) and/or (15) are present since the first moments of the reaction (Figure 7); the formation of intermediate (15) would

take place by the elimination of triflic acid from intermediate (12) and prior to a second nucleophilic capture by the acetonitrile- d_3 which leads to (14). The kinetic behavior of intermediates (14) and/or (15) (Figure 7) shows that these species form quickly and then decay, coexisting until the last moments of the reaction. Intermediate (13) (Figure 8) is the first step of the so-called aliphatic route,^{13b} whereas intermediate (15) would be the first of the olefinic and (14) the common final intermediate. No unambiguous explanation for the cross-peak at 6.20/106.5 could be found; its presence under laboratory conditions was not detected.¹⁴ The progress of the reaction through the aliphatic and/or olefinic route and the relative rate of both pathways will depend on the stability of intermediate (12).

Overall, the findings arising from these HSQC correlations reveal for the first time the presence of olefinic intermediates (14) and/or (15) and confirm preliminary results previously observed in ultrafast HMBC measurements where labeled reactants were used.^{13c} In order to get further confirmation on

the nature of the detected intermediates, we exploited the valuable insight arising from the chemical shifts observed along the correlated ^1H and ^{13}C dimensions. Table 1 shows the

Table 1. Observed and Calculated Chemical Shifts of the Different Species Involved in the Reaction

	observed (CD_3CN) ^a		calculated (CDCl_3) ^b		calculated Gaussian 09 ^d
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	
7	2.64	26.33	2.60		24.70 ^f
					193.05 ^f (216.00) ^e
8	3.26	23.71			28.75 ^e
		196.90			202.40 ^e
9 ^{g,e}	8.33	119.01	6.85		123.02 ^e
10	5.85	105.76	5.94		103.20 ^f (118.60) ^e
	5.49		4.50		
11	2.09	28.40			31.21 ^e
12	2.01	28.05	1.64		33.60 ^f
13	1.84	30.26	2.04		33.30 ^f
14	5.89	114.50	5.08		110.70 ^e
	5.54		4.97		
15	5.89	114.50	5.15		146.60 ^e
	5.54		4.99		

^aSee the Supporting Information. ^bAveraged values of chemical shifts ACD/Laboratories (release 8.00). ^cDifferences between observed and calculated chemical shifts are due to the nature of solvent. ^dCalculated with TMS (^{13}C = TMS value Gaussian 09 – value ^{13}C compound Gaussian 09). ^eObtained with M06-2X approximation. ^fObtained with B3LYP approximation.

experimental chemical shifts arising from the ultrafast series and compares them against expectations stemming from the various structures that are postulated to participate in the reaction scheme proposed in Figure 8. The ^1H NMR chemical shift estimations were performed for the nitrilium-salt intermediates (12–15), using the commercial chemical shift calculator software ACD/Laboratories (release 8.00). ^{13}C NMR shifts were calculated within the GIAO approximation on the PCM-M06-2X/6-31+G* (solvent = acetonitrile) with optimized geometries using the Gaussian 09 suite of programs. In all cases we find very good agreement between the observed values and the values predicted/calculated for the postulated structures; these calculations permit to distinguish between (14) and (15) and assign (14) to the triflic olefinic nitrilium-salt intermediate formed.

5. CONCLUSIONS

The real-time spectroscopic approaches herein described allowed us to uncover a new and interesting sequence of events in the mechanistic pathway of the alkylpyrimidine formation from aliphatic ketones and alkyl nitriles promoted by triflic anhydride. This was largely thanks to the advent of new ultrafast 2D NMR techniques that, operating under low gradients made possible by the use of selective band excitations, succeeded in monitoring the organic reaction using unlabeled compounds. Using this new selective and low-gradient-strength based UF sequence, it was possible to confirm the presence of intermediates reported in earlier studies such as (8) and (14) as well as intermediates (11–13) that were here detected for the first time. Estimations and calculations of NMR chemical shifts are in very good agreement with the proposed structures. These findings have permitted us to propose for the first time a new

and complete mechanism involving two different and concurrent pathways—one aliphatic and the other olefinic—for the progress of the reaction. The evolution from the starting ketone to the final pyrimidine could be monitored and rationalized in high detail. In summary, we believe that real-time dynamic 2D NMR methodologies of the kind described in this work could open valuable new ways in the kinetic monitoring and characterization of complex dynamic chemical systems and in the elucidation of the variety of mechanisms underlying these transformations.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Further details regarding experimental procedures, 1D and 2D spectra of products, and 3D animations. Complete ref 19. This material is free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

lucio.frydman@weizmann.ac.il; aherrera@quim.ucm.es

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support from MICINN (grant CTQ2010-14936), the Israel Science Foundation (ISF 447/09), ERC Advanced grant no. 246754, EU's BioNMR grant no. 261863, a Helen and Kimmel Award for Innovative Investigation, and the generosity of the Perlman Family Foundation. G.O. acknowledges postdoctoral support from the Feinberg Graduate School (Dean Fellowship) and from the Fulbright Foundation. Z.P. acknowledges Universidad Complutense de Madrid for a predoctoral fellowship. We gratefully acknowledge Dr. Israel Fernández and Ángel Sánchez (UCM) for theoretical calculations and predictions of ^{13}C chemical shifts.

■ REFERENCES

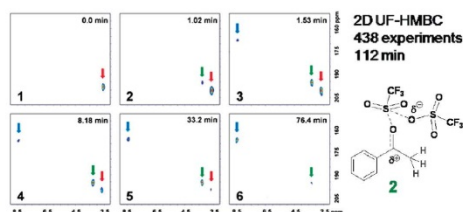
- (1) (a) Pozharskii, A. F.; Soldatenkov, A. T.; Katritzky, A. R. In *Heterocycles in Life and Society*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1997. (b) Eicher, T.; Hauptmann, S. In *The Chemistry of Heterocycles*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003. (c) Katritzky, A. R. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Academic Press: Oxford, U.K., 2002; Vol. 82.
- (2) Rewcastle, G. W. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Aitken, A., Ed.; Elsevier Science: Oxford, U.K., 2008; Vol. 8, pp 117.
- (3) (a) von Angerer, S. In *Science of Synthesis*; Yamamoto, Y., Ed.; Thieme: Stuttgart, Germany, 2003; Vol. 16, pp 379. (b) Hill, M. D.; Movassaghi, M. *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 6836–6844.
- (4) (a) Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Ramiro, P.; Molero, D.; Almy, J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3026–3032. (b) Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Martín, N.; Chioua, M.; Chioua, R.; Sánchez-Vázquez, A.; Molero, D.; Almy, J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1697–1703. (c) Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Martín, N.; Chioua, M.; Chioua, R.; Sánchez-Vázquez, A.; Molero, D.; Almy, J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5817–5823. (d) Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Ramiro, P.; Sánchez, A.; Torres, R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4545–4547. (e) Martínez-Álvarez, R.; Herrera, A. *Targets Heterocycl. Syst.* **2008**, *12*, 59–85.
- (5) (a) Movassaghi, M.; Hill, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14254–14255. (b) Movassaghi, M.; Hill, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4592–4593. (c) Hill, M. D.; Movassaghi, M. *Synthesis* **2007**, 1115–1119. (d) Movassaghi, M.; Hill, M. D. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2018–2023. (e) Ahmad, O. K.; Hill, M. D.; Movassaghi, M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8460–8463. (f) Menor-Salvan, C.; Ruiz-Bermejo, M.;

- Guzmán, G. L.; Osuna-Esteban, S.; Veintemillas-Verdaguer, S. *Chem.–Eur. J.* **2009**, *15*, 4411–4418. (g) Bannwarth, P.; Valleix, A.; Gree, D.; Gree, R. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4646–4649. (h) Yan, S.; Tang, Y.; Yu, F.; Lin, J. *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 487–490. (i) Lin, M.; Chen, Q.-z.; Zhu, Y.; Chen, X.-l.; Cai, J.-j.; Pan, Y.-m.; Zhan, Z.-p. *Synlett* **2011**, 1179–1183.
- (6) Lai, P.-S.; Taylor, M. S. *Synthesis* **2010**, 1449–1452.
- (7) (a) García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Moreno Jiménez, F.; García Fraile, A.; Subramanian, L. R.; Hanack, M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1627–1630. (b) Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Chioua, M.; Chioua, R.; Sánchez, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10053–10058. Chemical transformations induced by triflic anhydride were reviewed, see: (c) Baraznenok, I. L.; Nenajdenko, V. G.; Balenkova, E. S. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3077–3119.
- (8) (a) Kupce, E.; Nishida, T.; Freeman, R. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *42*, 95–122. (b) Kupce, E.; Freeman, R. *J. Magn. Reson.* **2003**, *162*, 300–310.
- (9) Hoch, J. C.; Stern, A. S. *Method Enzymol.* **2001**, *338*, 159–78.
- (10) (a) Gal, M.; Frydman, L. In *Multidimensional NMR methods for the Solution State*; Morris, G. A., Emsley, J. W., Eds.; Wiley&Sons: Chichester, U.K., 2010; pp 43–60. (b) Mishkovsky, M.; Frydman, L. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 429–448.
- (11) Frydman, L.; Scherf, T.; Lupulescu, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 15958–15862.
- (12) (a) Gal, M.; Schanda, P.; Brutscher, B.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1372–1377. (b) Gal, M.; Lee, M. K.; Varani, G.; Frydman, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 9192–9197.
- (13) (a) Gal, M.; Mishkovsky, M.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 951–956. (b) Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E.; Gal, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6274–6277. (c) Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Gutiérrez, E. M.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 144–147.
- (14) (a) Pelupessy, P.; Duma, L.; Bodenhausen, G. *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 169–174. (b) Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 224516/1–224516/11. (c) Giradeau, P.; Shrot, Y.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13902–13903. (d) Giradeau, P.; Akoka, S. *J. Magn. Reson.* **2010**, *205*, 171–176.
- (15) Brunner, P.; Ernst, R. R. *J. Magn. Reson.* **1979**, *33*, 83–106.
- (16) Wolinski, K.; Hinton, J. F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251–8260.
- (17) M06–2X method; Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 157–167.
- (18) PCM method: (a) Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129. (b) Pascual-Ahuir, J. L.; Silla, E.; Tuñón, I. *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 1127–1138. (c) Barone, V.; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
- (19) Frisch, M. J. et al. *Gaussian 09*, revision B.01, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (20) ¹³C NMR data for carbocations: (a) Breitmeier, E.; Voelter, W. In *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, 3rd ed.; VCH: New York, 1987. (b) Stadler, D.; Goepfert, A.; Rasul, G.; Olah, G. A.; Prakash, S.; Bach, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 312–318.
- (21) Kanemasa, S. In *Science of Synthesis*; Murahashi, S., Ed.; Thieme: Stuttgart, 2001; Vol 19, pp 53–65.
- (22) (a) Darbeau, R. W.; Gible, R. E.; Pease, R. S.; Bridges, D. E.; Siso, L. M.; Heurtin, D. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1084–1090. (b) White, E. H.; DePinto, J. T.; Polito, A. J.; Bauer, L.; Roswell, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3708–3709.
- (23) Shrot, Y.; Shapira, B.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.* **2004**, *171*, 163–170.

ORGANIC
LETTERS2010
Vol. 12, No. 1
144–1472D Ultrafast HMBC: A Valuable Tool for
Monitoring Organic Reactions[§]Antonio Herrera,^{*,†} Encarnación Fernández-Valle,[‡] Eva M. Gutiérrez,[†]
Roberto Martínez-Álvarez,[†] Dolores Molero,[‡] Zulay D. Pardo,[†] and Elena Sáez[‡]*Departamento de Química Orgánica and CAI de RMN Facultad de Químicas,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
aherrera@quim.ucm.es*

Received November 4, 2009

ABSTRACT



Ultrafast 2D HMBC spectroscopy permits real-time monitoring of a reaction based on the structural changes produced in a carbonyl carbon atom. This new technique was used to study the reaction of ketones, nitriles, and TiF_4 , affording relevant information about new intermediates and kinetic data.

Traditional $n\text{D}$ NMR experiments are collected as an array of 1D scans and are intrinsically time-consuming.¹ Different proposals to speed up $n\text{D}$ NMR spectroscopy have been described in recent years.² Among them, ultrafast-NMR spectroscopy (UF-NMR) alone or coupled with other methodological elements into a single scheme has shown its capability of delivering any type of $n\text{D}$ spectrum in a single scan by spatially encoding the indirect-domain interactions.³ Real-time monitoring of dynamic chemical systems, i.e., organic reactions, can be done as they happen.⁴

[§] Dedicated to Prof. Antonio García Martínez on the occasion of his retirement.

[†] Departamento de Química Orgánica.

[‡] CAI de RMN.

(1) (a) Jeener, J. *Lecture at International Ampère Summer School*, Basko Polje, Yugoslavia, 1971. (b) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.

(2) (a) Frydman, L. C. R. *Chimia* **2006**, *9*, 336. (b) Schanda, P.; Brutscher, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8014. (c) Kupče, E.; Freeman, R. *J. Biomol. NMR* **2003**, *25*, 349.

(3) (a) Mishkovsky, M.; Frydman, L. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 429. (b) Tal, A.; Shapira, B.; Frydman, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 2732.

(4) Gal, M.; Mishkovsky, M.; Frydman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 951.

Recently we have studied the synthesis of alkylpyrimidines from aliphatic ketones by two-dimensional UF-TOCSY, which has permitted the collection of a complete multidimensional data set within a single continuous acquisition. The evolution of the reactants from early stages of the reaction, the presence of different nitrilium-type intermediates, and the generation of reaction products can be monitored.⁵ Despite these important findings, no direct information regarding structural changes in the carbonyl carbon atom was obtained. The reason is clear. Since it is a quaternary carbon, its evolution cannot be detected using 2D homonuclear sequences such as COSY or TOCSY or heteronuclear such as HSQC. On the other hand, a UF-HMBC pulse sequence can offer direct and more precise information about the structural changes that take place on the carbon core and protons attached at neighbor positions. Chemical shifts obtained from 2D HMBC $^2J/\rho$ correlations should permit real-time observation of the changes produced. This information can be

(5) Herrera, A.; Fernández-Valle, E.; Martínez-Álvarez, R.; Molero, D.; Pardo, Z. D.; Sáez, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6274.

10.1021/o1902532f © 2010 American Chemical Society
Published on Web 11/30/2009

very important since the carbonyl carbon atom plays a decisive role in numerous organic reactions.

Although the chemistry of triflic anhydrides and their reactions with carbonyl compounds is well-known, some mechanistic questions still remain open.⁶ Thus, it has been accepted for many years that the reaction consists of the electrophilic attack of the anhydride on the carbonyl oxygen; this results in the formation of the short-lived (trifluoromethanesulfonyl)carbenium ion (**2**) (Figure 1). Despite this no data about

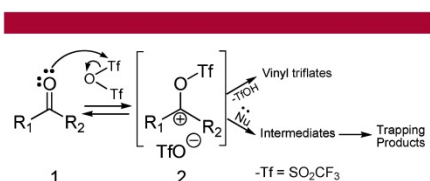


Figure 1. Reaction possibilities from ketones and triflic anhydride.

the structure and kinetic behavior of the crucial intermediate **2** are yet known. Depending on the nature of the carbonyl compound and the reaction conditions, there are different possibilities for **2**; it can lead directly to vinyl triflates or to different products after trapping by an external nucleophile.

In this paper we studied the organic reaction described above and monitored how the carbonyl carbon atom evolves during the process. Our aim is to identify possible intermediates formed. We chose a simple aliphatic-aromatic ketone, acetophenone, as the model compound and studied its reaction with triflic anhydride in the presence of an excess of acetonitrile acting as nucleophile and the solvent. This leads to pyrimidines as main products. Labeled ¹³C-carbonyl-acetophenone and [D₃]acetonitrile were used as reactants. ¹³C-Carbonyl-labeled ketone ensures the detection of short life intermediates and overcomes sensitivity problems. Attempts done with unlabeled ketones failed. The use of [D₃]acetonitrile eliminates the necessity of solvent suppression. The reaction was carried out inside a standard 500 MHz spectrometer with conventional hardware and a 5 mm NMR tube. The reactants were added with a fast mixing device. For experimental details and procedure see Supporting Information.

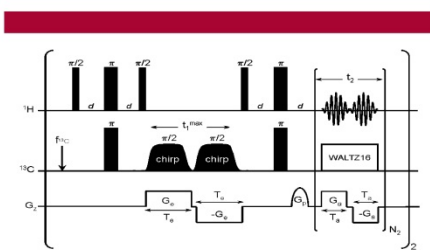


Figure 2. Ultrafast two-dimensional HMBC implemented to monitor changes on the carbonyl carbon atom.

Figure 2 shows the scheme of the 2D UF-HMBC sequence used. This sequence consists basically of a continuous spatial encoding ultrafast HSQC sequence in which the delay *d* is set to 25 ms in order to monitor ²*J* and ³*J* couplings of 10 Hz.⁷

In this UF scheme, contrary to traditional approaches, the spectral widths in both indirect and direct dimensions are dependent on each other. The greater the spectral width that must be covered in both dimensions, the poorer the digital resolution in the indirect domain.⁸ Furthermore, the spectral width and therefore the resolution in the indirect domain depends on the strength *G_a* and duration *T_a* of the decoding gradient, and both of these are limited. Because a wide spectral range in the indirect domain needed to be covered to detect the possible intermediates, we decided to monitor two different spectral windows in this dimension. For this purpose we alternated the same sequence with different indirect dimension frequency offsets. The acquisition of these two data sets was repeated during the progress of the reaction.

A total of 219 UF-HMBC spectra for each spectral window were recorded over a total time of 112 min. Each single spectrum was measured for 5.37 s, and a measurement was repeated every 10 s. For acquisition conditions see Supporting Information.

Figure 3 shows a series of six representative 2D UF-HMBC spectra recorded (spectra 1–6). These spectra correspond to the first window studied. The ranges examined were 210–150 ppm for ¹³C, which covers the carbonyl region and 9–2 ppm for ¹H. Spectra were numbered 1–6 (referred to as HMBC-1, etc). Cross-peaks assigned to starting and final products were confirmed using standard 1D and 2D spectra (see Supporting Information).

Spectrum HMBC-1 (0.0 min) corresponds to the solution of ketone **1** in [D₃]acetonitrile before the addition of Tf₂O. HMBC-1 shows a cross-peak at 198.9–2.56 ppm due to the ²*J* coupling between the carbonyl carbon and the methyl protons of **1** (red arrow). The addition of Tf₂O produced a small change in the position of the cross-peak from **1**. In HMBC-2, taken 1.02 min after the addition, a new cross-peak appeared at 195.2–3.26 ppm (green arrow). This peak intensified in HMBC-3 (1.53 min), decreased clearly in HMBC-5 (33.2 min), and remained close to the detection limit in HMBC-6 (76.4 min). Simultaneously, the cross-peak (167.4–8.38, blue arrow) that belongs to the pyrimidine **5** increased its intensity (HMBC-3 to HMBC-6). The signal from **1** decreased (HMBC-1 to HMBC-5) and is absent in HMBC-6.

In our opinion, this new cross-peak (green arrow) depicted in Figure 3 belongs to the complex **2** formed from ketone **1** and triflic anhydride. The rise and fall of **2** during the reaction clearly shows its character as intermediate. Structures of **1** and **2** are similar and therefore produce cross-peaks close to each

(6) (a) García Martínez, A.; Herrera Fernández, A.; Moreno Jiménez, F.; García Fraile, A.; Subramanian, L. R.; Hamack, M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1627. (b) Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Ramiro, P.; Molero, D.; Almy, J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3026. (c) Herrera, A.; Martínez-Álvarez, R.; Chioua, M.; Chioua, R.; Sánchez, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10053. (d) Baraznenok, I. L.; Nenajdenko, V. G.; Balenkova, E. S. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3077.

(7) Shrot, Y.; Shapira, B.; Frydman, L. *J. Magn. Reson.* **2004**, *171*, 162. (8) Frydman, L.; Lupulescu, A.; Scherf, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9204.

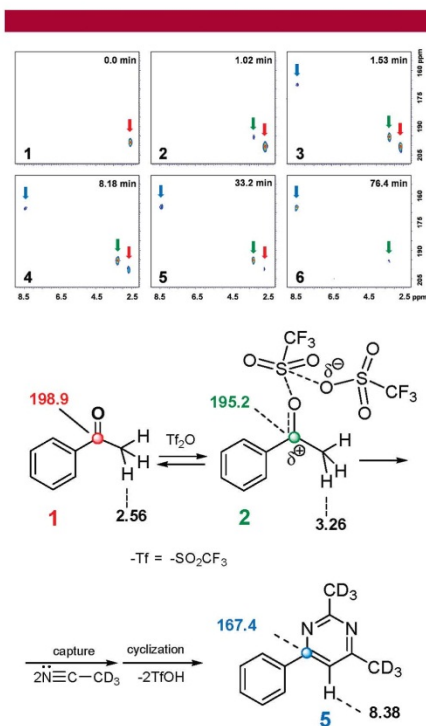


Figure 3. A series of 6 UF-HMBC experiments (1–6) taken at different times throughout the reaction (scale is in ppm) and shifts from the participating reactant **1**, product **5**, and intermediate **2**.

other. The structure of benzylic intermediate **2** agrees with its stability (relative to **1**) and also with the observed small shielding of the carbonyl carbon⁹ together with a displacement to higher frequencies of the neighbor methyl protons. Benzyl cations like **2** have been shown to have relatively long lifetimes since the phenyl ring stabilizes the positive charge formed on the carbonyl carbon. They have been generated thermally and trapped in organic solvents such as acetonitrile.¹⁰ The calculated chemical shifts (ACD/Laboratories 8.00 Release) are in good agreement with this new cross-peak.

After 1.53 min, a new cross-peak is detected in HMBC-3 which belongs to the final pyrimidine **5** (167.4–8.38, blue arrow). Its intensity increases in HMBC-4 to HMBC-6.

(9) ¹³C NMR data for carbocations: (a) Breitmeier, E.; Voelter, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, 3rd ed.; VCH: New York, 1987. (b) Stadler, D.; Goepfert, A.; Rasul, G.; Olah, G. A.; Prakash, S.; Bach, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 312.

(10) (a) Darbeau, R. W.; Gibble, R. E.; Pease, R. S.; Bridges, D. E.; Siso, L. M.; Heurtin, D. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2001**, *2*, 1084. (b) White, E. H.; DePinto, J. T.; Polito, A. J.; Bauer, I.; Roswell, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3708.

Figure 4 again shows a series of six representative 2D UF-HMBC spectra recorded corresponding to the second window

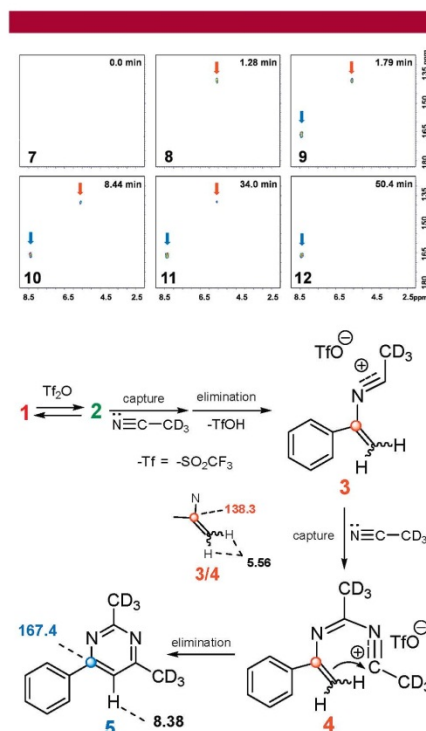


Figure 4. A series of 6 UF-HMBC experiments (7–12) obtained at increasing times along the reaction (scale is in ppm) and shifts from product **5** and participating nitrilium intermediates **3/4**.

studied (spectra 7–12). The ranges examined now are 180–120 ppm for ¹³C, covering the olefinic-aromatic zone and 9–2 ppm for ¹H. Spectra are numbered 7–12 (referred to as HMBC-7, etc). Obviously no HMBC signals were produced by the starting ketone **1** (HMBC-7, 0.0 min). After 1.28 min a new cross-peak at 138.3–5.56 is observed in HMBC-8. We assign this cross-peak (orange arrow) to the C=CH₂ correlation from a mixture of the olefinic nitrilium salt intermediates **3/4**. Their calculated chemical shifts (ACD/Laboratories 8.00 Release) are in agreement with the observed new signal.

The intensity of intermediates **3/4** decreases (HMBC-9 to HMBC-11) and finally disappears in HMBC-12. The intermediate character of (**3/4**) is shown again with their rise and fall during the reaction. The presence of pyrimidine **5** increases (HMBC-9 to HMBC-12). The presence of vinyl triflates formed by elimination of triflic acid from intermediate **2** was not detected in the UF-HMBC spectra. However

this cannot be ruled out below the detection limit of the sequence applied. The reaction was additionally monitored by ^1H NMR, and the formation of a minor amount of vinyl triflates was observed. An animation of this process was made using the 219 experiments of the double set of HMBC spectra registered and the combined mechanistic information (see Supporting Information).

The variation in intensity of participant species detected along the reaction studied is clearly shown in Figure 5. Here

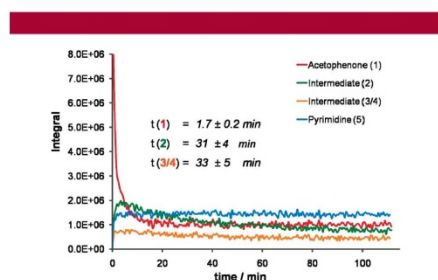


Figure 5. Averaged integrated peak intensity as a function of time for starting ketone (1), intermediates (2 and 3/4), and final pyrimidine (5).

are displayed the integrals of the cross-peaks versus time. The t lifetimes of starting ketone (1) and intermediates

(2 and 3/4) were obtained by fitting the data points to the equation $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) + I_\infty$.

Values shown in Figure 5 gave reaction rate measurements, which permits an evaluation of the reactive behavior of intermediates.

In conclusion, a two-dimensional UF-HMBC experiment is able to monitor an organic reaction and afford important structural and mechanistic information about the chemical environment and evolution of a reactive quaternary center. This technique allows the detection of different intermediate species. In the present case it has permitted the detection of an intermediate (trifluoromethanesulfonyl)carbenium ion 2 and has confirmed the presence of nitrilium salt intermediates 3/4. Work is in progress to extend this methodology to studies on unlabeled carbonyl compounds and to apply the ultrafast schemes to other dynamic systems.

Acknowledgment. We acknowledge a research grant from MICINN (CTQ2007-61973) and Prof. Lucio Frydman (Department of Chemical Physics, Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel) for his scientific support. We would like to thank Prof. John Almy (Faculté d'Enologie, Université de Bordeaux II, 33405 Talence cedex, France) for his helpful discussions.

Supporting Information Available: Experimental procedures and spectra. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL902532F

Communications

NMR Spectroscopy

DOI: 10.1002/anie.200902387

Real-Time Monitoring of Organic Reactions with Two-Dimensional Ultrafast TOCSY NMR Spectroscopy**

Antonio Herrera,* Encarnación Fernández-Valle, Roberto Martínez-Álvarez, Dolores Molero, Zulay D. Pardo, Elena Sáez, and Maayan Gal

Multidimensional nuclear magnetic resonance plays a number of essential roles in present day spectroscopy. It is also an integral part of the image formation protocol in magnetic resonance imaging (MRI).^[1] Traditional two-dimensional experiments are intrinsically time consuming, because many t_1 increments have to be acquired to obtain two-dimensional spectra with adequate digital resolution in the indirect dimension.^[2] Proposals for accelerating multidimensional NMR spectroscopy include non-Fourier transform schemes,^[3] the acquisition of multiple NMR spectra in a single experiment,^[4] and “single scan” multidimensional NMR spectroscopy, also called ultrafast NMR spectroscopy (UF NMR), have been introduced. The latter methodology was inspired by echo planar imaging (EPI)^[5] and was developed by Frydman et al.^[6] It permits the collection of complete multidimensional NMR data sets within a single continuous acquisition. This new methodology is compatible with existing standard (TOCSY, HSQC, MRI) and recently described combined multidimensional pulse sequences,^[7] and it can be implemented with conventional hardware. This attractive feature enables ultrafast NMR to examine dynamic processes, that is, organic reactions and their mechanisms as they happen in real time.^[8]

Figure 1 shows the schematic of the two-dimensional UF-TOCSY sequence used.^[9] The sequence uses a continuous spatial encoding^[10] which was implemented by pairs of RF pulses which excite/store spins over the full length, L , of the sample. The sample was swept over intervals $t_1^{\text{max}}/2$ whereas $\pm G_z$ external gradients were applied. The offsets of such pulses were thus chirped over a $\pm \gamma G_z L/2$ span, and their amplitudes calibrated as effective $\pi/2$ nutations by setting γB_1 as a function of $0.25[(2\gamma G_z L/t_1^{\text{max}})]^{1/2}$.

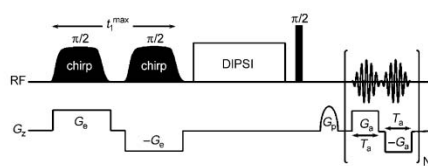


Figure 1. The ultrafast two-dimensional TOCSY used to carry out real-time characterizations. DIPSI = decoupling in the presence of scalar interactions.

We focused our attention on one-pot syntheses of pyrimidines and similar heterocyclic compounds, which we had previously developed.^[11] Pyrimidines are an important class of compounds which includes numerous natural, pharmaceutical, and functional materials.^[12] Elegant new procedures have been described^[13] and revealed decisive information on the mechanistic details of the reaction between carbonyl compounds and strong electrophiles such as trifluoromethanesulfonic acid anhydride (Trf_2O).^[11,14] In spite of the importance of these reactions, no spectroscopic confirmation of the postulated intermediates or kinetic data on the reaction have been reported.

Using a medium field 500 MHz spectrometer, we have now applied UF NMR methodology to monitor the reaction between aliphatic ketones and Trf_2O in the presence of nitriles. We have determined how the signals of the starting and final products evolve as they happen, in real time and attempted to detect the presence of intermediates. We chose a symmetric aliphatic ketone, 3-pentanone (**1**), as the model compound to react with a two-fold amount of Trf_2O in $[\text{D}_5]\text{acetonitrile}$, which served as both a co-reactant and solvent.

Scheme 1 shows the previously proposed reaction mechanism,^[14] which begins with the electrophilic attack of triflic anhydride onto the ketone (**1**) to form the short-lived (trifluoromethanesulfonyl)carbenium ion **2**. Cation **2** can undergo 1) rapid elimination of a proton leading to a mixture of *Z/E* vinyl triflates **3**, or 2) trap two molecules of acetonitrile in quick succession, and then undergo elimination of triflic acid and cyclization to finally lead to pyrimidine **7**. The formation of pyrimidine in high yield (>95%) accompanied by a small amount (5% <) of vinyl triflate indicates^[11] that the efficient nucleophilic trapping of the cationic species **2** occurs faster than the loss of a proton. The trapping pathway leads to the formation of the triflyloxy nitrilium salt intermediate **4**, which then captures another molecule of acetonitrile to give the intermediate **5**. The elimination of

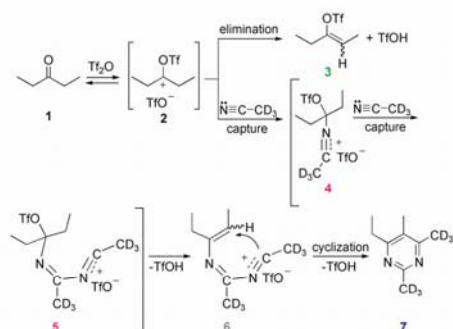
[*] Prof. Dr. A. Herrera, Prof. Dr. R. Martínez-Álvarez, Z. D. Pardo
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid (Spain)
Fax: (+34) 93-394-4205
E-mail: aherrera@quim.ucm.es

E. Fernández-Valle, Dr. D. Molero, Dr. E. Sáez
CAI de RMN, Facultad de Químicas
Universidad Complutense de Madrid

M. Gal
Department of Chemical Physics
Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot (Israel)

[**] We thank the MICINN (project CTQ2007-61973) and MEC (project PCI2005-A7-0094) for financial support and Prof. Lucio Frydman for his scientific support. We would also like to acknowledge Paul Schanda for assisting in building the injection device.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200902387>.



Scheme 1. The reaction between ketones and triflic anhydride in the presence of nitriles as nucleophiles.

triflic acid from **5** takes place easily since the triflate anion is a formidable leaving group,^[15] leading to the *Z/E* olefinic nitrilium intermediate **6**. Data about the species **5** have not been described although nitrilium salts are present in different reactions having electrophilic reagents, and should be relatively stable since the positive charge can be delocalized onto either the nitrilium nitrogen atom or onto the nitrilium carbon atom.^[16] Both *Z*- and *E*-**6** lead, after rapid cyclization and loss of triflic acid, to the same pyrimidine **7** (95% yield).

We applied the UF TOCSY sequence (Figure 1) to the study of this reaction and recorded 525 two-dimensional TOCSY experiments. Values of various parameters controlling the acquisition and excitation gradients were optimized, and the excitation pulses were chosen to achieve optimum resolution without appreciable loss of spectral width.

The aliphatic range $\delta = 0.00$ – 3.70 ppm was examined and changing concentrations of cross peaks representing the coupled methylene and methyl hydrogen atom signals of the ethyl groups from the species present were noted. A mixing time of 20 milliseconds produces COSY cross-peaks. Higher values permit the detection of TOCSY interactions, but in this case led to overcrowded spectra. The species were assigned structures on the basis of their substituents. Species **1**, **3**, **4**, **5**, **6**, and **7** were monitored and their appearance and disappearance were determined in real time, thereby revealing important information about the mechanism of the reaction.

The addition of the reactants employed a simple fast mixing device (see the Experimental Section). We estimate that this assembly has a kinetic dead time of 1–2 seconds, which is sufficiently short to permit the detection of certain transient intermediates and determine kinetics by using UF TOCSY.

Figure 2 illustrates a series of 12 representative two-dimensional TOCSY spectra which were recorded in succession and numbered 1–12 (referred to as TOCSY-1, etc.) Cross-peaks assigned to starting and final products were confirmed using standard one-dimensional and two-dimensional spectra. TOCSY-1 corresponds to a solution of the ketone **1** in $[D_3]$ acetonitrile. Cross-peaks from the ethyl group

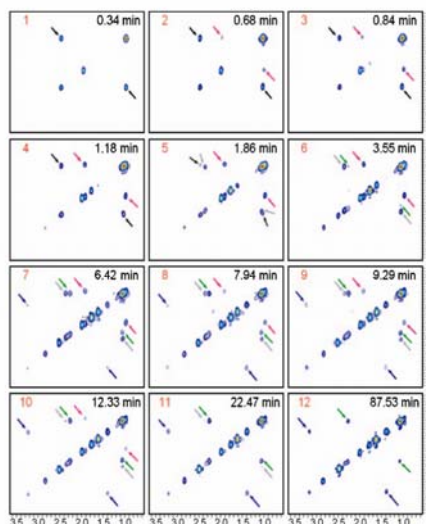


Figure 2. A series of two-dimensional TOCSY NMR spectra taken at different times throughout the reaction (scale is in ppm). 525 TOCSY experiments were acquired. Data were collected at 37°C at approximately every 10.0 s following the sequence depicted in Figure 1. Time points are shown within each window.

($\delta = 2.48$ – 1.04 ppm, black arrows) are clearly observed. The spectra in TOCSY-2–TOCSY-12 reflect the reaction mixture after the addition of the solution of ketone **1** in $[D_3]$ acetonitrile to a solution of Tf_2O in $[D_3]$ acetonitrile. In TOCSY-2, 0.68 minutes after the addition, new cross-peaks appear at lower frequencies ($\delta = 1.97$ – 1.00 ppm, magenta arrows). These peaks intensify until TOCSY-4 (1.18 min) then decrease and fall below the recording limit after TOCSY-10. This variation in intensity is more clearly shown in Figure 3, which displays the intensities of the cross peaks as a function of time. Clearly the cross-peaks represent an intermediate which is formed directly from ketone **1**. The intensity of the cross-peaks from ketone **1** decrease exponentially and are absent after TOCSY-5 (1.86 min; also see Figure 3). The formation of a new intermediate **6** (2.34 – 1.06 ppm, grey arrows) is initially detected in TOCSY-5, and one of its cross-peaks partially overlap with one from ketone **1** because of insufficient resolution along the indirect dimension.^[17] The intensity of the peak increases rapidly until TOCSY-7, then decreases (TOCSY-8–TOCSY-11) and is no longer recorded after TOCSY-12.

The formation of the *Z/E* vinyl triflate side products **3** ($\delta = 2.36$ – 1.08 ppm, green arrows) is initially detected in TOCSY-6 and is observed up to the end of the sequence. New cross-peaks caused by the ethyl group of the final pyrimidine **7** are initially detected in TOCSY-7 ($\delta = 3.15$ – 1.38 ppm, blue

Communications

arrows). The intensities of the cross-peaks for **7** increase exponentially and level off toward the end of the sequence. The positions of the signals from the *Z/E* vinyl triflates **3** and the pyrimidine **7** were confirmed through standard one-dimensional and two-dimensional experiments (see the Supporting Information).

We assigned the new correlations (magenta arrows) to the nitrilium salt intermediates **4** and **5** (Scheme 1). Their calculated chemical shifts (ACD/Labs 8.00 Release) are in agreement with the new signals observed. The intermediate nitrilium salts **4** and **5** appear as a mixture at an early stage of the reaction (TOCSY-2, 0.68 min), prior to the appearance of the signals from the *Z/E* vinyl triflates **3** (TOCSY-6, 3.55 min), confirming that the short lived species **2** is captured faster by Ti_2O than it loses a proton. Intermediate **5** easily eliminates TiOH to afford the olefinic nitrilium salt intermediate **6** (TOCSY-5, 1.86 min). Probably as a result of their low intensity, no allylic correlations could be detected. The presence of the double bond causes the cross-peaks from the ethyl group of the intermediate **6** to appear at higher field than those in intermediate **5**. These cross-peaks persist until TOCSY-11. An animation of this process was made using the first 211 TOCSY experiments (see the Supporting Information).

Figure 3 shows the intensities versus time of the various species that were as part of the reaction mixture. The intermediate characteristics of **4**, **5**, and **6** are shown with their rise and fall during the course of the reaction. The $t_{1/2}$ lifetimes of the starting ketone **1**, intermediates **4**, **5**, and **6** were obtained by fitting the data points to the equation $I(t) = I_0 \exp(-t/t_{1/2}) + I$. Values shown in Figure 3 gave reaction rate measurements which permit evaluation of the reactive behavior of the intermediates. The points chosen were taken from measurements starting at 0.0, 1.2, and 3.2 minutes respectively.

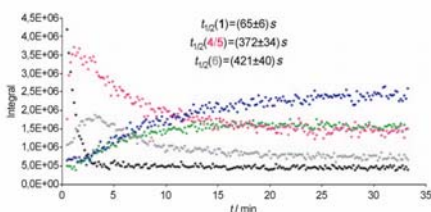


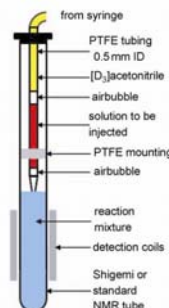
Figure 3. The averaged integrated peak intensity as a function of time for reactant **1** (●), intermediates **4**, **5** (●), and **6** (●), and final products **3** (●) and **7** (●).

In conclusion, the reaction between a simple ketone, 3-pentanone, and triflic anhydride in the presence of $[\text{D}_3]\text{acetonitrile}$ was monitored by two-dimensional UF TOCSY using a standard 500 MHz spectrometer and a 5 mm NMR tube. The evolution of the reactants, presence of intermediates, and generation of reaction products were observed. These results represent another example of the

possibilities made accessible by the UF NMR methodology. Real-time monitoring of the multistep reaction described above revealed important data about its mechanistic and kinetic aspects. Additional studies about new applications of the ultrafast methodology are in progress in our laboratory.

Experimental Section

A solution of Ti_2O (29.6 mg; 150 mm) in CD_3CN (0.5 mL) was prepared and added to a 5 mm NMR tube. A fast mixing device was devised and consisted of a long Teflon injection tube which connected a syringe with a Luer-lock tip to the reaction mixture inside a simple 5 mm NMR tube (see diagram). The NMR tube was fitted with a cap having a hole and a bearing to minimize oscillations of the injection



tube. In the fully loaded position, the injection tube contained, in order from the bottom tip upward: an air bubble (ca. 10 μL ; about 1–2 cm length), the solution to be injected [3-pentanone (6.03 mg; 100 mm) of in CD_3CN (2.0 mL)], another air-bubble, about (20 μL ; about 3–4 cm in the injection tube). The upper part of the injection tube was filled with CD_3CN to efficiently propagate the pressure throughout the injection tube. The bottom end of the injection tube was 1–2 mm inside the solution (see figure). The plastic cap was adjusted to maintain the injector at the correct height inside the NMR tube. The vertical position of the NMR tube was adjusted with the tube spinner and best results were achieved when the bottom of the NMR tube was approximately 10 mm below the lower end of the detection coil. Once the NMR tube with the spinner and the injection tube was fully assembled and placed into the detection coil zone, the bottom tip of the injection tube was well above the detection coil. Standard NMR adjustments were carried out before starting the TOCSY experiments. Acquisition of TOCSY experiments were started 20 s (2 scans) before the injection of the 3-pentanone solution and scans were recorded every 10 s. A total of 525 TOCSY scans were recorded. The acquisition parameters were: bandwidth of chirp pulse: 60 kHz; $G_x = 8 \text{ G cm}^{-1}$; $t_{\text{exc}}^{\text{chirp}} = 10 \text{ ms}$; $G_z = 20 \text{ G cm}^{-1}$; $T_x = 0.246 \text{ ms}$; $N_z = 64$; gradient switching time = 40 μs . These parameters correspond to a spectral window of $\text{SW1} = 3.63 \text{ ppm}$ and $\text{SW2} = 3.50 \text{ ppm}$. A sinusoidal purge gradient of 16 G cm^{-1} during 200 μs was applied before acquisition. The data were sampled every 1 μs . Time used for the DIPSI sequence was 20 ms. For each experiment a suitable shearing was carried out and data were zero filled before the T2 Fourier transformation. Spectra were represented in magnitude

mode. To carry out such calculations a variety of Matlab 7.3.0 (Math Works Inc.) programs were developed.

Received: May 5, 2009

Published online: July 14, 2009

Keywords: heterocycles · NMR spectroscopy · reaction mechanisms · TOCSY

- [1] a) *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, (Eds.: D. M. Grant, R. K. Harris), Wiley, New York, **1996**; b) *Modern Magnetic Resonance* (Ed.: G. A. Webb), Springer, London, **2006**; c) R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun in *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford, **1987**; d) M. Levitt, *Spin Dynamics*, Wiley, New York, **2001**.
- [2] a) J. Jeener, Lecture at International Ampère Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, **1971**; b) W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.
- [3] a) For a comprehensive review, see: R. Freeman, E. Kupce, *J. Biomol. NMR* **2003**, *27*, 101–113; E. Kupce, T. Nishida, R. Freeman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *42*, 95; b) D. Rovnyak, C. Filip, B. Itin, A. S. Stern, G. Wagner, R. G. Griffin, J. C. Hoch, *J. Magn. Reson.* **2003**, *161*, 43; c) J. Ashida, E. Kupce, J. P. Amoureux, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 129.
- [4] P. Nolis, M. Pérez-Trujillo, T. Parella, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7639–7641; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7495–7497.
- [5] M. K. Stehling, R. Turner, P. Mansfield, *Science* **1991**, *254*, 43–50.
- [6] a) L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15858–15862; b) L. Frydman, A. Lupulescu, T. Scherf, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9204–9217.
- [7] M. Gal, P. Schanda, B. Brutscher, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1372–1377.
- [8] M. Gal, M. Mishkovsky, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 951–956.
- [9] Y. Shrot, B. Shapira, L. Frydman, *J. Magn. Reson.* **2004**, *171*, 163–169.
- [10] For a review, see Y. Shrot, L. Frydman, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052209.
- [11] a) A. García Martínez, A. Herrera Fernández, F. Moreno Jiménez, A. García Fraile, L. R. Subramanian, M. Hanack, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1627–1630; b) A. Herrera, R. Martínez-Álvarez, P. Ramiro, D. Molero, J. Almy, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3026–3032.
- [12] For reviews, see a) K. Undheim, T. Benneche in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 6 (Eds.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. Scriven, A. McKillop), Pergamon, Oxford, **1996**, pp. 93–231; K. Undheim, T. Benneche in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 6 (Eds.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. Scriven, A. McKillop), Pergamon, Oxford, **1996**, pp. 1177–1307; b) I. M. Lagoja, *Chem. Biodiversity* **2005**, *2*, 1–50; c) J. P. Michael, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 627–646.
- [13] M. Movassaghi, M. D. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14254–14255.
- [14] A. Herrera, R. Martínez-Álvarez, M. Chioua, R. Chioua, A. Sánchez, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10053–10058.
- [15] I. L. Baraznenok, V. G. Nenajdenko, E. S. Balenkova, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3077–3119.
- [16] S. Kanemasa, *Sci. Synth.* **2004**, *19*, 53–65.
- [17] P. Pelulessy, L. Duma, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 169–174.